

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

ESTUDIO DE LOS CAMBIOS TOPOLÓGICOS
QUE EXPERIMENTA EL DNA
DURANTE LA REPLICACIÓN

VIRGINIA LÓPEZ MARTÍNEZ

Madrid, 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Proliferación Celular y Desarrollo

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

ESTUDIO DE LOS CAMBIOS TOPOLÓGICOS

QUE EXPERIMENTA EL DNA

DURANTE LA REPLICACIÓN

Memoria presentada por

Virginia López Martínez, licenciada en Bioquímica,

para optar al grado de Doctor

Director del trabajo de Tesis:

Dr. Jorge Bernardo Schvartzman Blinder

Madrid, 2011

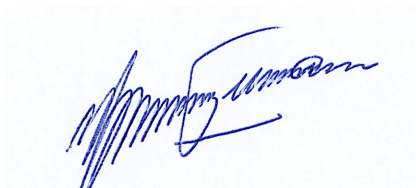
El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado por Virginia López Martínez, bajo la dirección del Dr. Jorge Bernardo Schwartzman Blinder, en el Departamento de Proliferación Celular y Desarrollo del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) de Madrid, con la financiación concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación a través del Proyecto BFU2008-00408 y del programa de becas de formación de personal universitario.

Opta al grado de Doctor



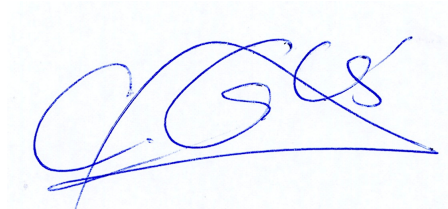
Virginia López Martínez

Vº Bº del Director de la Tesis



Dr. Jorge Bernardo Schwartzman Blinder
Profesor de investigación. CIB-CSIC

Vº Bº del Tutor de la Tesis



Dra. Carmela Calés Bourdet
Profesora Titular. Departamento de Bioquímica

*A mis padres y a Pablo
por compartir mis inquietudes,
ilusionados y orgullosos.*

Agradecimientos

Resulta difícil expresar en unas pocas líneas todo el agradecimiento que siento hacia las personas que me han acompañado en esta etapa de mi vida. Empezaré por aquellas de las que he aprendido que investigar es una manera de vivir...

En primer lugar quiero dar las gracias al Dr. Bernardo Schvartzman por brindarme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral en su laboratorio. Gracias por tu dedicación, por tus enseñanzas, por tu cercanía y tu constante buen humor. Asimismo, quiero dar las gracias a la Dra. Débora Krimer y el Dr. Pablo Hernández por su interés y las brillantes aportaciones con las que han contribuido a mejorar mi trabajo. Solo espero saber aplicar vuestras enseñanzas a mi futura vida profesional, pues creo que es el mejor homenaje que os puedo ofrecer a los tres.

Quisiera mostrar mi gratitud a la Dra. Carmela Calés por haber aceptado la tutoría de este trabajo, por sus valiosos comentarios académicos y su buena disposición a la hora de facilitar los trámites burocráticos.

Gracias a los Doctores Luis Aragón y Giovanni Dietler por permitirme realizar las estancias en sus laboratorios de Londres y Lausanne.

No puedo olvidarme de las personas que me acompañaron durante mis primeros pasos en la investigación. Entre ellas ocupa un lugar destacado la Dra. Ginesa García-Rostán, pues gracias a ella me inicié en el mundo de la investigación en mi Asturias natal. Gracias también a Juan, Patricia, Lucía, Giacomo, y muy especialmente a Mar Pérez del CNIO por su bondad, comprensión y ayuda.

A todas mis compañeras de laboratorio del CIB, gracias porque en ningún lugar me había sentido tan querida y valorada. Empezaré primero por las que ya no están: Zaira y María Tenorio. Gracias a Zaira, nuestra añorada postdoc, por estar siempre dispuesta a resolver mis dudas y enseñarme truquitos de laboratorio. Gracias María T., por tu sentido del humor, tu paciencia, tus consejos y tu entusiasmo investigador, tan contagioso. Gracias a María Rodríguez por llenar el labo de alegría y heavy metal, y por darme ánimos. Gracias Estefanía, mi compañera en esto de la topología, por estar siempre pendiente de mí, por tus consejos y tus mimos. Gracias también al resto de compañeros del CIB: Bea G., Bea D., Eva, Cris, Gonzalo, Leo, Javi y José Alberto porque habéis llenado de buenos momentos mis años aquí.

Desde estas líneas quiero además dar las gracias a todas las personas que han facilitado mi trabajo y me han arropado durante las estancias: a Jörg y Luis del CIB por su buena disposición y su amabilidad a la hora de prestarme el AFM. Gracias a Jonathan Baxter, Mary Mc Ivoy y, muy especialmente, a Miguel Esteras por hacer que mi estancia en Londres fuese maravillosa además de productiva. Gracias a Livan, Guillaume, Dusan, Andrea, Fabrizio, Christine, Charles y Andrzej Kulik que hicieron de mi estancia en Suiza una experiencia inolvidable.

En este punto quiero dar las gracias a Marisa a quien considero a la vez maestra y amiga. Gracias porque sabes que esta Tesis es tan tuya como mía (aunque no es la única que llevas a tus espaldas), gracias por tu generosidad, tu paciencia y dedicación constante aún a costa de restarte horas de sueño. Gracias porque eres brillante y con tu ayuda no se me ha resistido casi ningún experimento. Muchísimas gracias por tus ánimos, mimos y buenos consejos (sólo te faltó darme una “ñalgaduca”...).

Tampoco me puedo olvidar de Manolo, a quien quiero dar las gracias por estar siempre pendiente de mis progresos y por su constante cariño. De todos los asturianos que hay en Madrid tú eres, sin duda alguna, mi favorito.

Gracias a Marta (mi Martita) por brindarme su amistad y su cariño desde el primer momento en que nos conocimos, en unas circunstancias no del todo felices. Gracias por tus consejos, tu apoyo y tus ánimos. Gracias por ser unas veces mi hermana mayor y otras mi hermana pequeña. Gracias también a toda tu familia por sus constantes muestras de cariño: Ana, Ángel, Sandra, la abuela Matilde y Edu.

Gracias a Silvia, por tu amistad desde que éramos dos renacuajos y por no olvidarte de mí a pesar del tiempo y la distancia. Gracias a mi amiga Susana, a quien conocí hace más de diez años y que sigue siendo tan genial y risueña. Gracias por mantenerte al tanto de mi aventura madrileña. Gracias también a Ger porque tu música me ha acompañado en muchos momentos. Gracias a Mar, que siempre se preocupa por mí y sabe valorar mi trabajo tanto como yo el suyo. Gracias por ser toda corazón. A Marigel y Pepe Luis, gracias por vuestras continuas muestras de cariño. A pesar de estar lejos, yo tampoco os olvido.

A mis futuros suegros, Carmen y Andrés, a quienes quiero muchísimo y admiro profundamente: gracias por vuestro apoyo constante y vuestros buenos consejos.

Gracias a Andrés (Adro), porque es un placer hablar de ciencia contigo, y gracias también a Aia que comprende bien lo que es dedicarle muchas horas al trabajo.

A mis padres, Conchita y José Luis, que son las personas a quienes más admiro. Mamá, eres la más inteligente, paciente y generosa del mundo y yo sólo aspiro a parecerme a ti. Gracias por quererme tanto, por darme tanto, por escucharme siempre. A mi padre, carismático y polifacético, debo darle las gracias por inculcarme el optimismo y el entusiasmo por todo lo que hago.

A mis abuelos Virginia y David. A la abuela, gracias porque ya sabes que además del nombre compartimos otras muchas cosas. Gracias por ser como eres, por estar siempre de buen humor y dar todo lo que tienes por los tuyos. Y al abuelo David gracias porque los dos arrastramos la fama de tener mal genio y, sin duda, yo lo he heredado de ti. Gracias por preocuparte por mí constantemente y seguir llamándome “la niña” aunque ya me haya hecho mayor...

A mi hermano, una de las personas más altruistas que conozco, siempre dispuesto a echar un cable a los demás, tan trabajador y optimista, gracias por cuidar siempre de

mí pero sobre todo por ser como eres. A mi cuñada Tatiana, gracias porque tu llegada a la familia fue una bocanada de aire fresco y alegría. Gracias al pequeño Pelayo, que está a punto de nacer y ya ha colmado a toda la familia, y muy especialmente a esta tía primeriza, de una inmensa alegría. ¡Estoy deseando cogerte en mis brazos!

Gracias Pablo, porque tuve la fortuna de conocerte hace algo más de cinco años y todavía soportas mis manías y alguna que otra rabieta. Conocerte es amarte. Sin tu cariño, sin tu apoyo, sin tu luz, yo no sería más que un planemo.

Virginia

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

Durante la replicación del DNA, los intermediarios de replicación (RIs) sufren cambios topológicos que afectan al superenrollamiento, encadenamiento y anudamiento. Los nudos en el DNA tienen consecuencias deletéreas y deben ser eliminados; por ello el papel del anudamiento de las cromátidas hermanas *in vivo* en procariotas continua siendo un misterio. Para estudiar esos nudos inter-cromátida y tratar de identificar la enzima responsable de anudar las cromátidas hermanas, construimos plásmidos de *Escherichia coli* con barreras para el avance de la horquilla de replicación. La electroforesis bidimensional en geles de agarosa junto con la microscopía de fuerza atómica nos permitió confirmar la naturaleza de las moléculas identificadas como RIs anudados. En procariotas, la Topoisomerasa IV (Topo IV) es la encargada de desanudar el DNA. Nuestros resultados apuntan a un posible papel dual de la Topo IV en el anudamiento: esta enzima sería también la responsable de crear los nudos inter- e intra-cromátidas durante la replicación. Proponemos un modelo según el cual en la región ya replicada algunos de los pases de hebra catalizados por la Topo IV atraparían cruces de pre-encadenamiento que conducirían a la formación de nudos. También analizamos el desencadenamiento de las cromátidas hermanas por la Topoisomerasa II (Top2) en eucariotas, para dilucidar si los cambios topológicos en el DNA producidos durante la mitosis favorecen dicho proceso. Para ello estudiamos los cambios topológicos de un minicromosoma circular a lo largo del ciclo de división en *Saccharomyces cerevisiae*. Nuestros resultados muestran que, al paso de las células por mitosis, los minicromosomas experimentan un cambio topológico drástico a modo de superenrollamiento positivo que requiere del huso mitótico y de la condensina Smc2. El desencadenamiento es un proceso crucial para la vida celular pero se desconoce cómo tiene lugar. Nuestro trabajo profundiza en la comprensión de este fenómeno pues demuestra que el superenrollamiento positivo en moléculas encadenadas maximiza el desencadenamiento de las cromátidas hermanas por parte de la Top2.

SUMMARY

As replication proceeds DNA replication intermediates (RIs) undergo topological changes that affect supercoiling, catenation and knotting. Nevertheless, the function and dynamics of these changes remain to be fully understood. In this context, the role of DNA replication knots in prokaryotes remains a mystery. DNA knots are very harmful for cells if not removed efficiently. However, sister chromatids become knotted *in vivo*. To identify the enzyme responsible for knotting and to study inter- and intra-chromatid knots in bacteria, we used *Escherichia coli* plasmids as a model system. We constructed plasmids bearing a unidirectional ColE1 origin and a polar replication fork barrier located at different distances from the origin. Two-dimensional agarose gel electrophoresis (2D gels) and atomic force microscopy allowed us to confirm the nature of the molecules identified as knotted RIs. In prokaryotes, Topoisomerase IV (Topo IV) unknots DNA molecules. Our results pointed out a possible dual role for Topo IV in knotting: we showed that this enzyme also makes inter- and intra-chromatid knots during DNA replication. We propose that Topo IV artlessly traps nodes when making strand passages, thus creating replication knots. Later on, the same removes them to allow the correct segregation of sister duplexes during cell division. In addition, we investigated the dynamics of Topoisomerase II (Top2)-mediated decatenation of sister chromatids in eukaryotes. Specifically, we investigated the topological changes that occur during mitosis to check whether they help decatenation. We used *Saccharomyces cerevisiae* as a model system and a centromeric minichromosome, which retains topological information after DNA extraction. The results obtained demonstrated that in yeast, centromeric minichromosomes undergo a dramatic change in their topology as the cells pass through mitosis. This change is characterized by the acquisition of positive supercoiling and requires the mitotic spindle and the condensin factor Smc2. Decatenation is a crucial step for cell reproduction but how it occurs is still poorly understood. Our study sheds light on the dynamics of this process. We showed that the positive supercoiling of catenated minichromosomes maximizes Top2 decatenating activity.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1	Topología del DNA	3
1.2	Propiedades topológicas: superenrollamiento del DNA	4
1.3	DNA topoisomerasas	7
1.3.1	DNA topoisomerasas de tipo I	8
1.3.2	DNA topoisomerasas de tipo II	9
1.4	Dinámica de los cambios topológicos durante la replicación: topología de los intermediarios de replicación	10
1.5	Anudamiento del DNA	13
1.6	Encadenamiento del DNA	15
1.7	Métodos de análisis de moléculas de DNA con distintas formas topológicas	16
1.7.1	Análisis de RIs mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa ..	17
1.8	Algunos problemas no resueltos de la topología de los RIs	18

2. OBJETIVOS 25

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Material biológico y medios de cultivo	29
3.1.1	Material biológico	29
3.1.2	Medios y cultivo de <i>E. coli</i>	30
3.1.3	Medios y cultivo de <i>S. cerevisiae</i>	31
3.1.3.1	Sincronización de cultivos de <i>S. cerevisiae</i>	32
3.2	Reactivos, enzimas y oligonucleótidos	33
3.2.1	Reactivos	33
3.2.2	Enzimas	34
3.2.3	Oligonucleótidos.....	35
3.3	Preparación de células de <i>E. coli</i> para su visualización mediante microscopía de epifluorescencia	35
3.4	Preparación de células de <i>S. cerevisiae</i> para su análisis mediante citometría de flujo	36
3.5	Construcción de plásmidos y minicromosomas	36
3.6	Transformación de <i>E. coli</i>	41
3.7	Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	41
3.8	Preparación del DNA.....	41
3.8.1	Extracción de DNA de <i>E. coli</i>	41
3.8.1.1	Extracción de DNA de plásmidos de <i>E. coli</i>	42
3.8.1.2	Extracción de formas replicativas de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	42
3.8.2	Extracción de formas replicativas DNA del minicromosoma pRS316 de <i>S. cerevisiae</i>	42
3.9	Digestiones enzimáticas.....	43
3.9.1	Digestión con la enzima de restricción <i>AlwNI</i>	43
3.9.2	Digestiones con endonucleasas de restricción de cadena sencilla	44
3.9.3	Digestión <i>in situ</i> con la enzima de restricción <i>EcoRI</i> entre la primera y la segunda dimensión	44
3.10	Análisis del DNA	45
3.10.1	Electroforesis en geles de agarosa	45
3.10.1.1	Electroforesis unidimensional	45
3.10.1.2	Electroforesis bidimensional neutra-neutra	46

3.10.1.3 Electroforesis bidimensional de formas intactas.....	46
3.10.1.4 Electroforesis bidimensional de formas digeridas	47
3.10.2 Transferencia del DNA a soportes sólidos	47
3.10.3 Marcaje e hibridación del DNA	47
3.10.3.1 Marcaje de sondas de DNA no radiactivas	47
3.10.3.2 Hibridación con sondas de DNA no radiactivas	47
3.10.4 Densitometría	48
3.10.5 Secuenciación	48
3.10.6 Enriquecimiento y aislamiento de RIs de plásmidos de <i>E. coli</i> en geles de agarosa	48
3.10.7 Observación y análisis de RIs de plásmidos en <i>E. coli</i> mediante microscopía de fuerza atómica	51
3.10.7.1 Preparación de muestras para su observación al microscopio de fuerza atómica	51
3.10.7.2 Observación y análisis de las muestras mediante AFM.....	53

4. RESULTADOS

4.1 Análisis de los RIs intactos de pBR-TerE@ <i>StyI</i> , pBR-TerE@ <i>AatII</i> y pBR-TerE@ <i>DraI</i> mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa	57
4.2 Análisis de RIs con la horquilla detenida a distintas distancias del origen tras la introducción de roturas de cadena sencilla dentro y fuera de la región replicada en células de la estirpe DH5 α F'	60
4.2.1 Análisis de los RIs de pBR-TerE@ <i>StyI</i> mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa tras su digestión con endonucleasas de restricción de cadena sencilla.....	60
4.2.2 Análisis de los RIs de pBR-TerE@ <i>AatII</i> mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa tras su digestión con endonucleasas de restricción de cadena sencilla.....	62
4.2.3 Análisis de los RIs de pBR-TerE@ <i>DraI</i> mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa tras su digestión con endonucleasas de restricción de cadena sencilla.....	63
4.3 Análisis plasmídico y fenotípico de la exposición a la temperatura restrictiva de células con la mutación <i>parE</i>	64
4.4 Análisis de RIs intactos con la horquilla detenida a distintas distancias del origen tras la introducción de roturas de cadena sencilla fuera de la región replicada en células parE10 crecidas a la temperatura restrictiva	66
4.5 Análisis de los RIs del plásmido pBR-TerE@ <i>DraI</i> en células parE10 tras la introducción de roturas de cadena sencilla en la región no replicada y expuestos a Topo IV <i>in vitro</i>	68
4.6 Análisis de los RIs de los plásmidos con la horquilla detenida a distintas distancias del origen en células parE10 crecidas a las temperaturas permisiva y restrictiva tras su digestión con <i>AlwNI</i>	69
4.7 Análisis de los RIs anudados del plásmido pBR-TerE@ <i>DraI</i> en células parE10 expuestos a la Topo IV <i>in vitro</i> y tras su digestión con <i>AlwNI</i>	71
4.8 Análisis de los RIs anudados del plásmido pBR-TerE@ <i>DraI</i> en células parE10 crecidas a distintos tiempos a la temperatura restrictiva y tras su digestión con <i>AlwNI</i>	72
4.9 Análisis de los RIs anudados del plásmido pBR-TerE@ <i>DraI</i> en células DS9038 y DS9039 tras su digestión con <i>AlwNI</i>	74

4.10	Análisis de RIs con la horquilla detenida a distintas distancias del origen mediante AFM.....	75
4.10.1	Comparación de la visualización de moléculas de DNA desnudas y recubiertas con RecA.....	77
4.10.2	Comparación de la visualización en dato de altura y dato de fase	80
4.10.3	Visualización de RIs del plásmido pBR-TerE@AatII.....	82
4.10.4	Visualización de RIs del plásmido pBR-TerE@DraI	85
4.11	Estudio del destino de las moléculas anudadas al término de la replicación.....	88
4.12	Estudio de la topología del minicromosoma pRS316 a lo largo del ciclo celular en cultivos sincronizados de <i>S. cerevisiae</i>	93
4.12.1	Estudio de la movilidad electroforética en geles unidimensionales de pRS316 durante el ciclo celular en presencia o ausencia de Top2	94
4.12.2	Estudio de la movilidad electroforética en geles bidimensionales de pRS316 durante la fase S del ciclo celular en la estirpe top2-td	95
4.12.3	Estudio de la movilidad electroforética en geles bidimensionales de pRS316 durante la mitosis en la estirpe top2-td	97
4.12.4	Estudio de la movilidad electroforética de pRS316 en geles unidimensionales durante el ciclo celular en la estirpe con el doble degon top2-td cdc20-td	98
4.12.5	Estudio de la topología de las formas intactas de pRS316 durante la mitosis en células de las estirpes top2-td y top2-td cdc20-td	99
4.12.6	Estudio de la topología de pRS316 durante la mitosis en células top2-td y top2-td cdc20-td mediante geles bidimensionales de agarosa en presencia de un agente intercalante	101
4.12.7	Estudio de la topología de pRS316 durante la mitosis en células top2-td y top2-td cdc20-td mediante geles bidimensionales de agarosa en presencia de cloroquina y tras la digestión parcial con <i>Nt.Bpu10I</i>	105
4.12.8	Estudio de la topología de las formas monoméricas de pRS316 en presencia y ausencia de Top2 mediante geles bidimensionales de agarosa con cloroquina	107
4.12.9	La condensina Smc2 se requiere para la inducción del $\Delta W(+)$	109
5.	DISCUSIÓN	
5.1	Dinámica de los cambios topológicos durante la replicación de plásmidos bacterianos	113
5.2	Anudamiento y desanudamiento de cromátidas hermanas durante la replicación de plásmidos en <i>E. coli</i>	113
5.3	Hipótesis del anudamiento por parte de la Topo IV	117
5.4	Consecuencias del bloqueo de la horquilla de replicación	119
5.5	Superenrollamiento y desencadenamiento de cromátidas hermanas en minicromosomas de <i>S. cerevisiae</i>	122
5.6	Consideraciones acerca de cómo el superenrollamiento promueve el desencadenamiento en procariotas y eucariotas	123
6.	CONCLUSIONES	127
7.	BIBLIOGRAFÍA	131

8. ANEXO: Baxter, J., Sen, N., López Martínez, V., Monturus de Carandini, E., Schwartzman, J. B., Diffley, J. F. X., and Aragón, L. (2010). Positive supercoiling of mitotic DNA drives decatenation by Topoisomerase II in eukayotes. Science 331, 1328-1332	157
--	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS

Figura 1	Esquema representativo de las distintas formas que puede adoptar una molécula de DNA circular	7
Figura 2	Esquema de un RI	12
Figura 3	Esquema de la estructura y modo de acción del degron inducible por temperatura	20
Figura 4	Mapa del plásmido pBR18	37
Figura 5	Mapa del plásmido pBR-TerE@ <i>StyI</i>	38
Figura 6	Mapa del plásmido pBR-TerE@ <i>AatII</i>	39
Figura 7	Mapa del plásmido pBR-TerE@ <i>DraI</i>	40
Figura 8	Mapa del minicromosoma pRS316	41
Figura 9	Diagrama esquemático del aislamiento de los RIs anudados a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión	50
Figura 10	Análisis, mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa, de las formas intactas de los plásmidos pBR-TerE@ <i>StyI</i> , pBR-TerE@ <i>AatII</i> y pBR-TerE@ <i>DraI</i> aisladas de células DH5 α F' de <i>E. coli</i>	59
Figura 11	Análisis de los RIs de pBR-TerE@ <i>StyI</i> mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa tras la introducción de roturas de cadena sencilla dentro o fuera de la región replicada	61
Figura 12	Análisis de pBR-TerE@ <i>AatII</i> mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa tras su digestión dentro o fuera de la región replicada	62
Figura 13	Análisis de pBR-TerE@ <i>DraI</i> mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa tras la digestión dentro o fuera de la región replicada	64
Figura 14	Análisis plasmídico y fenotípico de la exposición de células parE10 a la temperatura restrictiva	65
Figura 15	Análisis de los RIs de los tres plásmidos crecidos en células parE10 a la temperatura restrictiva y tratados con endonucleasas de cadena sencilla fuera de su región replicada	67
Figura 16	Análisis de los RIs de pBR-TerE@ <i>DraI</i> , en la estirpe parE10 a la temperatura restrictiva, tratados con <i>Nt.BbvCI</i> fuera de la región replicada y con Topo IV <i>in vitro</i>	68
Figura 17	Análisis de los RIs de los plásmidos con la horquilla detenida a distintas distancias del origen en células parE10 crecidas a las temperaturas permisiva y restrictiva y digeridas con <i>AlwNI</i>	70
Figura 18	Análisis de los RIs anudados de pBR-TerE@ <i>DraI</i> crecidos en células parE10 a 43°C y expuestos a <i>AlwNI</i> y Topo IV <i>in vitro</i>	72
Figura 19	Análisis de los RIs anudados de pBR-TerE@ <i>DraI</i> crecido distintos tiempos a la temperatura restrictiva	73
Figura 20	Análisis de los RIs anudados de pBR-TerE@ <i>DraI</i> en células mutantes <i>xerC</i> y <i>xerD</i> tras su digestión con <i>AlwNI</i>	75
Figura 21	Validación, mediante Southern blot, del enriquecimiento en RIs anudados de las muestras pBR-TerE@ <i>AatII</i> y pBR-TerE@ <i>DraI</i>	76
Figura 22	Visualización de moléculas de DNA mediante TM-AFM	78
Figura 23	Comparación de la visualización mediante TM-AFM de moléculas de DNA desnudas y recubiertas con RecA	79
Figura 24	Ejemplos de RIs de pBR-TerE@ <i>AatII</i> (A) y pBR-TerE@ <i>DraI</i> (B) parcialmente recubiertos con RecA	80
Figura 25	La obtención de imágenes mediante el parámetro fase proporciona información a escala nanométrica acerca de la estructura de la superficie de la muestra	81
Figura 26	Visualización de RIs de pBR-TerE@ <i>AatII</i> mediante TM-AFM	83

Figura 27	Visualización de RIs anudados de pBR-TerE@ <i>Aat</i> II mediante TM-AFM	84
Figura 28	Visualización de RIs de pBR-TerE@ <i>Dra</i> I mediante TM-AFM.....	85
Figura 29	El estudio de cada cruce permite discernir si se trata o no de un RI anudado	86
Figura 30	Visualización de RIs anudados de pBR-TerE@ <i>Dra</i> I mediante TM-AFM.....	87
Figura 31	Análisis del plásmido pBR18 crecido en la estirpe C600parC1215 a la temperatura restrictiva y tratado con <i>Nb.Bsm</i> I	89
Figura 32	Diagramas representativos del resultado de la electroforesis bidimensional tras la digestión parcial con <i>Eco</i> RI antes de la segunda dimensión.....	90
Figura 33	Análisis mediante digestión en gel del DNA de pBR18 crecido en la estirpe C600parC1215 a la temperatura restrictiva y tratado con la endonucleasa de cadena sencilla <i>Nb.Bsm</i> I	91
Figura 34	Análisis del plásmido pBR18 crecido en las estirpes DS9039 y N4971	92
Figura 35	Los minicromosomas encadenados experimentan un cambio topológico <i>in vivo</i> durante la mitosis.....	94
Figura 36	Análisis de las formas intactas de pRS316, aislado de células top2-td de <i>S. cerevisiae</i> , mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa	96
Figura 37	Análisis de pRS316, aislado de células top2-td de <i>S. cerevisiae</i> , mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa tras el tratamiento con la endonucleasa de cadena sencilla <i>Nt.Bpu</i> 10I	96
Figura 38	Análisis mediante electroforesis bidimensional de pRS316 intacto y tratado con <i>Nt.Bpu</i> 10I, tras 80 minutos de la liberación de las células top2-td de forma sincrónica en el ciclo celular	97
Figura 39	Los minicromosomas encadenados experimentan una transición topológica <i>in vivo</i> tras la formación del huso mitótico	98
Figura 40	Análisis mediante electroforesis bidimensional de las formas intactas de pRS316 aislado de células top2-td y de células con el doble degro, top2-td cdc20-td, crecidas en presencia o ausencia de nocodazol	100
Figura 41	Análisis del DNA intacto de pRS316 mediante geles bidimensionales en donde la segunda dimensión tuvo lugar en presencia de 1 µg/ml de cloroquina.....	102
Figura 42	Análisis del DNA intacto de pRS316 mediante geles bidimensionales en donde la segunda dimensión tuvo lugar en presencia de 20 µg/ml de cloroquina.....	103
Figura 43	Análisis del DNA intacto de pRS316 mediante geles bidimensionales en donde la primera dimensión transcurrió en presencia de 0.5 µg/ml de cloroquina	104
Figura 44	La transición de Cat C a Cat C* se debe a un cambio del ΔWr, de (-) a (+), inducido por el huso mitótico	106
Figura 45	Los husos mitóticos inducen en los monómeros desencadenados un alto nivel de ΔWr (+) que es rápidamente relajado en presencia de Top2.....	108
Figura 46	Para que tenga lugar la inducción ΔWr (+) durante mitosis se requiere, además de los husos, la condensina Smc2	110
Figura 47	Los pasos de hebra aleatorios realizados por la Topo IV en regiones de cruce entre las cromátidas hermanas capturan la topología de dichos cruces formando nudos inter-cromátida	117

ABREVIATURAS

AccOCRI	Acumulación de intermediarios de replicación con una o más roturas de cadena sencilla
AFM	Microscopía/Microscopio de Fuerza Atómica (<i>Atomic Force Microscopy/Microscope</i>)
APTES	3- Aminopropiltrietixisilano
ARS	Secuencia de replicación autónoma de <i>S. cerevisiae</i>
ATP	Adenosín trifosfato
bp	Pares de bases
Cat A	Encadenado de tipo A
Cat B	Encadenado de tipo B
Cat C	Encadenado de tipo C
Cat C*	Encadenado de tipo C premitótico en <i>S. cerevisiae</i>
CCC	Molécula circular covalentemente cerrada (<i>Covalently closed circle</i>)
CCCms	Monómeros circulares covalentemente cerrados
CCCs	Moléculas circulares covalentemente cerradas
CCRI	Intermediario de replicación covalentemente cerrado
CCRI	Intermediarios de replicación covalentemente cerrados
ColE1 Ori	Origen de replicación de ColE1

DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Sal disódica del ácido etilendiaminotetracético
Kb	Kilopares de bases
Kn	Nudo (<i>Knot</i>)
KnCatA	Encadenado de tipo A anudado
Knm	Monómero anudado (<i>Knotted monomer</i>)
LB	medio de cultivo Luria Bertani
Ld	Molécula dimérica lineal
Lds	Moléculas diméricas lineales
Lk	Índice de ligamiento
Lm	Molécula monomérica lineal (<i>Linear monomer</i>)
Lms	Moléculas monoméricas lineales
Ls	Moléculas lineales
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfónico
OC	Molécula circular con una o más roturas de cadena sencilla (<i>Open circle</i>)
OCds	Dímeros con una o más roturas de cadena sencilla

OCms	Monómeros con una o más roturas de cadena sencilla
OCs	Moléculas circulares con una o más roturas de cadena sencilla
OCRI	Intermediario de replicación con una o más roturas de cadena sencilla
OCRI _s	Intermediarios de replicación con una o más roturas de cadena sencilla
Ori	Origen de replicación
RI	Intermediario de replicación (<i>Replication intermediate</i>)
RI _s	Intermediarios de replicación (<i>Replication intermediates</i>)
SDS	Dodecil sulfato sódico
SSC	Solución salina de citrato de sodio
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TM-AFM	Microscopía de Fuerza Atómica de contacto intermitente (<i>Tapping-mode AFM</i>)
TopCCC _s	Topoisómeros de moléculas circulares covalentemente cerradas
TopCCCRIs	Topoisómeros de intermediarios de replicación covalentemente cerrados
Top 2	Topoisomerasa II de <i>S. cerevisiae</i>

Topo I	Topoisomerasa I de <i>E. coli</i>
Topo II	Topoisomerasa II de <i>E. coli</i>
Topo III	Topoisomerasa III de <i>E. coli</i>
Topo IV	Topoisomerasa IV de <i>E. coli</i>
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Tw	Índice de torsión (<i>Twist</i>)
URA3	Gen de uracilo
Wr	Índice de superenrollamiento (<i>Writhe</i>)
ΔW_r	Variación del índice de superenrollamiento con respecto al W_r del DNA relajado
σ RI	Intermediarios de replicación rotos

*Existe una fuerza motriz más
poderosa que el vapor, la
electricidad y la energía atómica: la
voluntad.*

A. Einstein (1879-1955)

1. INTRODUCCIÓN

Han pasado casi 60 años desde que James Watson y Francis Crick presentaran su modelo de la estructura del DNA (Watson and Crick, 1953b) apoyándose en la llamada fotografía 51, una imagen de la molécula obtenida mediante difracción de rayos X por Rosalind Franklin. Según este modelo el DNA es una doble hélice constituida por dos cadenas de polinucleótidos complementarias y antiparalelas. La conformación más frecuente es la denominada DNA-B, una doble hélice dextrógira con un período de aproximadamente 10,5 pares de bases (Watson and Crick, 1953a).

Además de ajustarse a las propiedades físicas y químicas del DNA, como bien apuntaron Watson y Crick, esa estructura en doble hélice dejaba entrever el mecanismo de replicación, revelando cómo esta molécula llevaba a cabo sus funciones biológicas (Watson and Crick, 1953b, a). La importancia de su hallazgo pronto quedó establecida, sentando las bases de la Biología Molecular moderna. Desde entonces, muchas investigaciones se han enfocado hacia el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la replicación, transcripción, recombinación y reparación del DNA. No obstante, quedan aún por averiguar aspectos fundamentales de la modulación de esos procesos así como su integración con otras funciones de la vida celular. En este ámbito, uno de los aspectos de mayor repercusión biológica lo ofrecen los cambios que ocurren en la estructura del DNA: su organización y su topología.

1.1. Topología del DNA.

La topología es una rama de las matemáticas que estudia las propiedades de un cuerpo que no varían cuando éste se deforma. Un ejemplo sería el de un paralelepípedo alargado que al sufrir una deformación adopta la forma de un cubo. El paralelepípedo original y el cubo resultante tienen distinta forma pero una serie de propiedades comunes. Esas propiedades invariables son el objeto de estudio de la topología.

El descubrimiento de la estructura en doble hélice del DNA llevó inmediatamente a preguntarse cómo se produciría la separación de las hebras entrelazadas para permitir la

replicación de la molécula y puso en evidencia el hecho de que durante la replicación surgen problemas topológicos (Cairns, 1963; Worcel and Burgi, 1972). La doble hélice del DNA es una estructura flexible, extremadamente dinámica, y el estudio de las distintas formas topológicas que puede adoptar comenzó hacia 1965. Ese año Vinograd y colaboradores observaron al microscopio electrónico que el DNA del virus del poliovirus podía encontrarse tanto en forma lineal como circular y que éstos últimos podían presentar distintas formas (relajados o enrollados sobre sí mismos) que denominaron topoisómeros (Vinograd et al., 1965). Los topoisómeros son pues distintas formas que pueden adoptar las moléculas de DNA circulares covalentemente cerradas (CCCs) sin que cambie su masa. Posteriormente esta observación se extendió a todas las moléculas de DNA circulares de doble cadena (Cozzarelli, 1980). La observación de que en todos los seres vivos el DNA está superenrollado, junto con el descubrimiento de las enzimas encargadas de modular la topología *in vivo* (Wang, 1971), sentaron las bases de una nueva disciplina dentro de la Biología Molecular que se denominó “Topología del DNA” (Wang, 2002).

Los cambios en la topología del DNA son esenciales para su función y la regulación de su metabolismo. Así, influyen en la unión de factores implicados en el inicio de la replicación, la transcripción, la correcta segregación de las cromátidas hermanas, la compactación del DNA, etc.

1.2. Propiedades topológicas: superenrollamiento del DNA.

El parámetro que mejor define la topología de una molécula CCC es el índice de ligamiento (Lk). Este índice se define matemáticamente como el número de veces que una cadena de la doble hélice cruza a la otra en un plano (Kornberg and Lorch, 1992; Bates and Maxwell, 1997). El Lk es una constante topológica que depende de dos propiedades geométricas del DNA -esto es, que pueden variar con la deformación de la molécula- denominadas índice de torsión (Tw) e índice de superenrollamiento (Wr). El Tw indica el número de veces que las dos cadenas del DNA giran una vuelta completa en el espacio alrededor del eje axial de la doble hélice. El Wr, una de las propiedades topológicas del DNA mejor estudiadas, es una medida de la torsión del eje axial de la doble hélice sobre sí

mismo: mide el número de veces que el eje de la doble hélice se cruza sobre sí mismo en un plano (Kornberg and Baker, 1992; Bates and Maxwell, 1997); o, de un modo más intuitivo, es la medida del enrollamiento de la doble hélice sobre sí misma (Lewin, 2000). Se trata de una propiedad exclusiva de los dominios topológicos cerrados puesto que si los extremos de la doble hélice estuvieran libres cualquier tensión estructural interna carecería de efecto ya que las dos cadenas de polinucleótidos podrían rotar sobre sí mismas liberando dicha tensión en los extremos (Bauer et al., 1980). De manera que el Wr sólo tiene lugar en moléculas CCCs o en moléculas lineales fijadas a membranas u otros elementos proteicos de manera que una región de las mismas, aunque lineal, se comporta como un dominio topológicamente cerrado. Las moléculas CCCs son típicas del genoma de bacterias, plásmidos, mitocondrias, cloroplastos y muchos virus. Se cree que el DNA de los cromosomas eucarióticos está organizado en bucles o lazos en cuya base el DNA está unido covalentemente a un esqueleto proteico por lo que estos bucles constituirían dominios topológicos cerrados equivalentes a los CCCs (Marsden and Laemmli, 1979; Giaever and Wang, 1988; Schiessel et al., 2001).

Matemáticamente, el ΔWr viene dado por el número de veces que una doble hélice cruza sobre sí misma con respecto al número de cruces que tendría en el estado relajado (Wr_0). Por convenio, se dice que el ΔWr es negativo (-) en el caso de las superhélices dextrógiras (que van en el sentido de las agujas del reloj) y positivo (+) en el de las levógiras (que van en el sentido contrario al de las agujas del reloj). En la gran mayoría de los seres vivos las moléculas de DNA presentan un ΔWr (-) (Gellert, 1981; Vosberg, 1985; Wang, 1985, 1987; Giaever et al., 1988; Giaever and Wang, 1988), aunque existen algunas excepciones como es el caso de las bacterias termófilas del género *Archaea*, cuyo DNA presenta un ΔWr (+) que se incrementa con el aumento de la temperatura (Mirambeau et al., 1984).

Se han descrito dos conformaciones para el DNA superenrollado denominadas plectonémica y toroidal. El superenrollamiento plectonémico es un tipo de conformación en la que el eje axial del DNA sigue una trayectoria superhelicoidal alrededor de otro segmento de la misma molécula; dicho de otro modo, la doble hélice del DNA está enrollada alrededor de otra parte de la misma molécula formando una hélice de orden

superior (Bates and Maxwell, 2005). El DNA purificado y en solución presenta un superenrollamiento plectonémico (Boles et al., 1990). Por el contrario, el superenrollamiento toroidal es un tipo de conformación del DNA superenrollado en donde el eje axial de la molécula sigue una trayectoria superhelicoidal alrededor del eje de un *torus* o aro imaginario, esto es, la doble hélice del DNA está enrollada alrededor de un *torus* formando una hélice de orden superior (Bates and Maxwell, 2005). El DNA de los organismos eucariotas, enrollado alrededor de los nucleosomas, presenta un superenrollamiento toroidal (Boles et al., 1990) que favorece la condensación del DNA necesaria para su empaquetamiento dentro del núcleo. Existen además modelos que explican la unión del DNA, en su conformación toroidal, a la superficie de muchas proteínas (Bates and Maxwell, 2005).

La tensión impuesta al añadir vueltas adicionales en la hélice del DNA se distribuye entre un cambio en el T_w y un cambio del W_r , es decir, ambas variables se compensan entre sí dando como resultado el valor de L_k . El L_k sólo puede cambiar si se producen roturas en el DNA (Wang, 1996), que pueden ser de cadena sencilla o de cadena doble y que en cualquier caso dan como resultado la eliminación del W_r ya que permiten que una o las dos cadenas de polinucleótidos gire la una sobre la otra liberando la tensión en los extremos.

Cuando hablamos de la introducción de roturas de cadena sencilla en el DNA *in vitro*, nos referimos al empleo de endonucleasas de restricción de cadena sencilla para convertir una molécula CCC en una molécula abierta y relajada llamada OC, esto es, en un DNA circular de doble cadena que contiene una rotura en el enlace fosfodiéster en una de las dos cadenas, como se muestra en el esquema de la figura 1.

En todo dominio topológico cerrado *in vivo* los procesos de replicación, recombinación y transcripción alteran el T_w y el W_r pero no el L_k . Para alterar el L_k *in vivo* las células disponen de unas enzimas especializadas que se describen en el siguiente apartado.

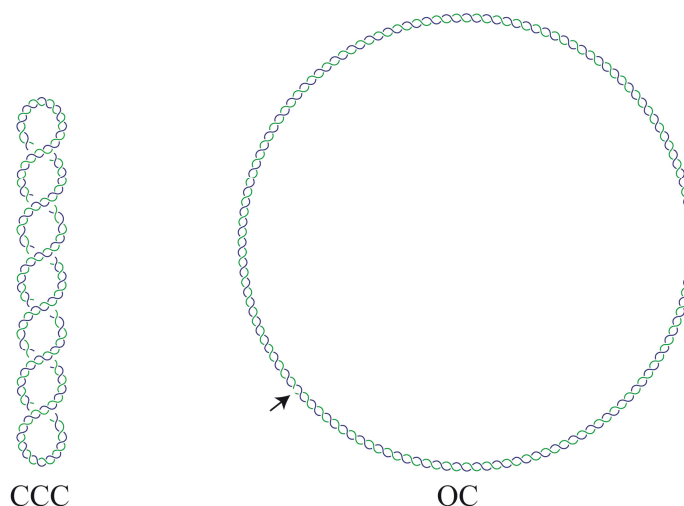


Figura 1. Esquema representativo de algunas de las distintas formas que puede adoptar una molécula de DNA circular. A la izquierda se muestra la forma superenrollada (CCC) y a la derecha la forma relajada (OC) que resulta de la introducción de una rotura de cadena sencilla (señalada por la flecha).

1.3. DNA topoisomerasas.

Las enzimas encargadas de modificar el Lk *in vivo* son las DNA topoisomerasas. Presentes en todos los seres vivos, estas enzimas crean roturas transitorias en el DNA que ayudan a resolver los problemas topológicos que surgen durante la replicación, transcripción, reparación y recombinación del DNA (Gellert, 1981; Wang, 1985; Wang and Prives, 1991; Champoux, 2001; Wang, 2002). Las roturas transitorias en el DNA van acompañadas de la formación de un enlace fosfodiéster entre un residuo activo de tirosina presente en la enzima y un grupo fosfato de uno de los extremos de la cadena de DNA interrumpida. La topología de la molécula de DNA puede ser modificada durante el tiempo que se mantenga ese enlace. Finalmente, el enlace se rompe y la enzima vuelve a unir los extremos rotos del DNA (Champoux, 2001). Debido al papel crucial que desempeñan para la supervivencia celular, las topoisomerasas son dianas de numerosas drogas citotóxicas; así, las topoisomerasas de procariotas son dianas de diferentes compuestos antibacterianos, mientras que en eucariotas las topoisomerasas son dianas de diversos compuestos antitumorales (Froelichammon and Osherooff, 1995).

Todas las topoisomerasas son capaces de eliminar el ΔW_r (-), pero sólo algunas pueden eliminar también el ΔW_r (+). En base a su mecanismo de acción las topoisomerasas se clasifican en dos grandes grupos: tipo I y tipo II, según corten una o las dos hebras de la doble hélice del DNA, respectivamente (Wang, 1996; Champoux, 2001; Wang, 2002; Forterre et al., 2007)

1.3.1. DNA topoisomerasas de tipo I.

Las topoisomerasas de tipo I cortan una hebra de la doble hélice y hacen rotar ésta una vuelta completa sobre la hebra intacta para finalmente volver a unir los extremos cortados. De esta forma cambian el Lk en valores de ± 1 (Brown and Cozzarelli, 1981).

Las topoisomerasas de tipo I bacterianas sólo son capaces de relajar el ΔW_r (-). *Escherichia coli* posee dos topoisomerasas de tipo I: la Topoisomerasa I (Topo I) (Wang, 1971) y la Topoisomerasa III (Topo III) (Dean et al., 1983). La Topo I relaja el ΔW_r (-) generado por detrás de la horquilla durante la transcripción (Liu and Wang, 1987). En cuanto a la Topo III, su papel biológico aún no está del todo definido pero se sabe que interacciona con la helicasa RecQ (Harmon et al., 1999) y parece estar implicada en la segregación cromosómica y en la maduración de intermediarios de recombinación (Zhu et al., 2001).

Las topoisomerasas de tipo I de las células eucariotas, en cambio, son capaces de relajar tanto el ΔW_r (-) como el (+). En *Saccharomyces cerevisiae* se conocen dos topoisomerasas de este tipo: la Topo I (Goto and Wang, 1985) que realiza un papel fundamental durante la transcripción y la Topo III (Champoux, 2001) que podría estar implicada en el desencadenamiento del DNA junto con la helicasa Sgs1 (Harmon et al., 1999). No obstante, se ha demostrado que en ausencia de Topo III el W_r del DNA no está afectado de forma notable (Kim and Wang, 1992).

1.3.2. DNA topoisomerasas de tipo II.

Las topoisomerasas de tipo II cortan ambas hebras de la doble hélice del DNA y transportan otra doble hélice a través de la que está interrumpida para finalmente volver a unir los extremos cortados (Wang, 1996; Nitiss, 1998; Wang, 1998; Champoux, 2001). De esta forma hacen que el Lk cambie en valores de ± 2 (Brown and Cozzarelli, 1979; Mizuuchi et al., 1980; Roca and Wang, 1994). Las topoisomerasas de tipo II, que están funcional y estructuralmente conservadas entre eucariotas y procariotas, actúan como dímeros y de un modo dependiente de ATP (Huang, 1994, 1996). Se dividen a su vez en dos subfamilias: las de tipo IIA y las de tipo IIB (Champoux, 2001; Wang, 2002). Estas últimas están peor caracterizadas y, aunque parecen compartir sus mecanismos de acción (Bergerat et al., 1997), presentan diferencias estructurales con las de tipo IIA (Nichols et al., 1999).

Las topoisomerasas de tipo IIA son las que están mejor caracterizadas. Se encuentran tanto en procariotas como en eucariotas y poseen estructuras similares (Berger et al., 1996; Huang, 1996; Champoux, 2001). Estas enzimas catalizan el paso de un doble hélice de DNA a través de otra doble hélice mediante un mecanismo denominado de dos puertas (Berger et al., 1996; Wang, 1998). Su estructura es similar a la de una tenaza o pinza abierta, dentro de la cual se sitúa la doble hélice de DNA que será cortada y que constituye el denominado segmento G (del inglés *gate*). Tras la unión de ATP, la pinza se cierra capturando una segunda doble hélice de DNA, denominada segmento T (del inglés *transported*) (Roca and Wang, 1992), que hará pasar a través de la rotura transitoria producida en el segmento G y será expulsada de la enzima por el lado opuesto al que entró (Roca and Wang, 1994; Berger et al., 1996; Roca et al., 1996). Este mecanismo de acción permite a estas enzimas realizar cambios topológicos en el DNA esenciales para la célula durante la replicación y la segregación cromosómica (Wang, 2002).

En *E. coli* existen dos topoisomerasas de tipo II: la DNA girasa (Gellert et al., 1976) y la Topoisomerasa IV (Topo IV) (Kato et al., 1988; Kato et al., 1990). La DNA girasa fue la primera topoisomerasa de tipo II descubierta y es la única conocida capaz de introducir $\Delta W_r (-)$ en el DNA *in vivo* empleando la energía de la hidrólisis del ATP (Gellert et al.,

1976). Su estructura consiste en un heterotetrámero compuesto por dos subunidades GyrA y dos subunidades GyrB (Klevan and Wang, 1980). Las subunidades GyrA están implicadas en la unión al DNA (Wang, 1998) y en la introducción de roturas transitorias en la doble hélice, mientras que la subunidades GyrB son las responsables de la actividad ATPasa. La DNA girasa mantiene la densidad de ΔW_r (-) necesaria para la iniciación de la replicación y la transcripción del DNA. Además, esta enzima participa en la fase de elongación de la replicación y la transcripción contribuyendo a la eliminación del ΔW_r (+) que se genera por delante de las horquillas debido a la acción de las helicasas. De este modo, elimina el estrés torsional cuya acumulación podría, eventualmente, detener ambos procesos.

La Topo IV bacteriana (Kato et al., 1990) es también un heterotetrámero cuyas subunidades ParC y ParE son homólogas de GyrA y GyrB, respectivamente (Peng and Mariani, 1993). *In vivo*, la Topo IV está especializada en eliminar el encadenamiento que surge entre las cromátidas hermanas durante y después de la replicación del DNA (Adams et al., 1992; Ullsperger et al., 1995; Zechiedrich and Cozzarelli, 1995; Zechiedrich et al., 1997; Deibler et al., 2001)

Las topoisomerasas de tipo II de eucariotas son capaces de relajar tanto el ΔW_r (-) como el (+), pero son incapaces de introducir ΔW_r (-). La única topoisomerasa de tipo II conocida en *S. cerevisiae* es la Topoisomerasa II (Top2) y está implicada fundamentalmente en la correcta segregación de las cromátidas hermanas (DiNardo et al., 1984; Holm et al., 1985).

1.4. Dinámica de los cambios topológicos durante la replicación: topología de los intermediarios de replicación.

En la gran mayoría de los seres vivos para que se inicie la replicación semiconservativa del DNA éste debe estar negativamente superenrollado. De este modo se facilita la separación de las cadenas parentales que serán usadas como molde por las DNA polimerasas durante la replicación (Marians et al., 1986; Funnell et al., 1987; Kanaar and

Cozzarelli, 1992; Crisona et al., 2000). Una vez que la iniciación ha tenido lugar, la elongación es llevada a cabo por un complejo multiproteico denominado replisoma. Actualmente se cree que no es el replisoma el que avanza sino que es el DNA el que pasa a través de él. Por delante del replisoma se encuentra la DNA helicasa, una proteína hexamérica responsable de la apertura de la doble hélice parental. Esa apertura genera una tensión topológica que da lugar a ΔW_r (+) por delante de la horquilla de replicación (Kornberg and Baker, 1992) que debe ser eliminado o de lo contrario se acumularía impidiendo el avance de la horquilla de replicación. En bacterias, la DNA girasa introduce ΔW_r (-) por delante de la maquinaria de replicación compensando así el ΔW_r (+) que genera el avance de la horquilla (Cozzarelli, 1980; Marians, 1992; Levine et al., 1998). Pero la acción de la DNA girasa no es suficiente para compensar ese ΔW_r (+) debido a que la procesividad de la DNA helicasa es mayor y el avance de la horquilla de replicación más rápido que la DNA girasa introduciendo ΔW_r (-) (Peter et al., 1998). En los estadios tempranos de la replicación, cuando la región no replicada es suficientemente grande, serían varias las DNA girasa que se podrían unir a esa región y su funcionamiento en serie podría conseguir la introducción de un nivel suficiente de ΔW_r (-). Sin embargo, a medida que la replicación progresa, la región no replicada va disminuyendo, de manera que cada vez es menor el espacio en el que podría actuar la DNA girasa (Champoux and Been, 1980). Este déficit de DNA girasa podría conducir a la eliminación de todo el ΔW_r (-) y a una eventual acumulación de ΔW_r (+) por delante de la horquilla en las etapas tardías de la replicación. Para resolver esta aparente paradoja, Champoux y Been sugirieron que el ΔW_r de los intermediarios de replicación (RIs) podría difundir a través de la horquilla de replicación y distribuirse tanto por delante como por detrás de la misma (Champoux and Been, 1980). De esta manera, en la región ya replicada podría actuar la otra topoisomerasa de tipo II presente en bacterias, la Topo IV, ayudando a la DNA girasa a compensar el ΔW_r (+) (Ullsperger et al., 1995; Peter et al., 1998; Alexandrov et al., 1999). En 1998 Peter y colaboradores, empleando microscopía electrónica, confirmaron la difusión del ΔW_r a través de la horquilla de replicación *in vivo* y llamaron pre-encadenados a los cruces de las cromátidas hermanas en la región ya replicada para distinguirlo del ΔW_r de la región aún no replicada (Peter et al., 1998). El nombre alude al hecho de que si esos pre-encadenados no son eliminados darán lugar a moléculas encadenadas al finalizar la replicación

(Champoux and Been, 1980; Kreuzer and Cozzarelli, 1980; Marians, 1992; Ullsperger et al., 1995; Peter et al., 1998; Alexandrov et al., 1999; Lucas et al., 2001).

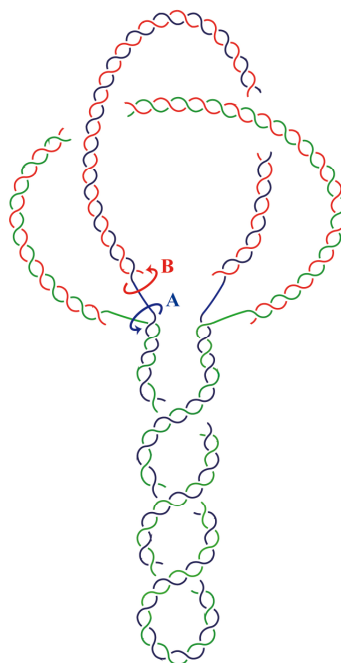


Figura 2. Esquema de un RI. En la región no replicada, las dos hebras parentales se representan en azul y verde. En la región replicada las hebras hijas se representan en rojo. La flecha azul (A) hace referencia al giro de las horquillas de replicación que hace posible que el ΔW_r de la región no replicada pase a la ya replicada en forma de pre-encadenamiento. La flecha roja (B) se refiere a la libertad de giro de las hebras hijas en torno a la correspondiente hebra parental.

En la figura 2 se muestra un RI en el que parte del ΔW_r (+) eventualmente acumulado en la región no replicada migró a la ya replicada dando lugar a pre-encadenados. De acuerdo a este modelo, la generación de ΔW_r (+) por delante de las horquillas de replicación sería compensada por la DNA girasa que introduciría ΔW_r (-) en la región no replicada y por la Topo IV que eliminaría pre-encadenados en la región ya replicada. Esto explicaría por qué la progresión de las horquillas de replicación está totalmente impedida sólo cuando ambas topoisomerasas de tipo II están mutadas (Hiasa et al., 1994; Levine et al., 1998; Khodursky et al., 2000). No obstante, si el encadenamiento entre dos moléculas de DNA es dextrógiro, como se asume generalmente (Adams et al.,

1992; Hiasa and Marians, 1996; Postow et al., 2001) no sería un sustrato adecuado para la Topo IV, ya que esta enzima actúa preferentemente sobre cruces levógiros (Crisona et al., 2000; Charvin et al., 2003). Para resolver esta nueva paradoja, algunos autores sugieren que la Topo IV es capaz de eliminar eficientemente encadenados dextrógiros *in vitro* en moléculas de DNA tan altamente encadenadas que los cruces dextrógiros modifican su geometría angular y se convierten en cruces levógiros, constituyendo así un sustrato adecuado para la Topo IV (Charvin et al., 2003).

En cuanto a las células eucariotas, parece ser que el ΔW_r (+) que se genera delante de la horquilla es eliminado gracias a la acción conjunta de la Topo I y la Top2 (Kim and Wang, 1989) y a la asociación casi inmediata de los nucleosomas a las dos cromátidas hermanas detrás de la horquilla (Lucchini et al., 2001).

No obstante, esta visión dinámica de la topología de la replicación no explica todas las formas topológicas que pueden adoptar los RIs; en concreto, aquellos RIs que presentan nudos en la región ya replicada (Viguera et al., 1996).

1.5. Anudamiento del DNA.

Tan pronto como se descubrieron las topoisomerasas se reparó en que se podían formar nudos en el DNA. Éstos pueden surgir de cualquier proceso que implique roturas de cadenas de DNA (incluyendo replicación, transcripción, recombinación y reparación) y, de no ser eliminados, sus efectos resultarían devastadores para la célula (Portugal and Rodriguez-Campos, 1996; Deibler et al., 2001; Olavarrieta et al., 2002b; Deibler et al., 2007). El anudamiento es pues otra de las propiedades topológicas del DNA (Bauer et al., 1980) y, al igual que sucede con el ΔW_r , sólo tiene lugar en dominios topológicos cerrados.

Existen varios sistemas de clasificación y nomenclatura de nudos (White et al., 1987). Una de las más utilizadas es la notación de Alexander-Briggs, n_i , en donde n representa el número de cruces al proyectar el nudo sobre un plano y la i sirve para distinguir nudos con el mismo número de cruces. Si bien esta notación no tiene en cuenta

la quiralidad del nudo, ésta puede ser indicada añadiendo los signos + y -. El tipo de nudo más simple que existe es el nudo de 3 cruces, también llamado nudo en forma de hoja de trébol (del inglés *trefoil*). Para establecer el signo topológico de los cruces existe una convención, también aplicable al W_r y el encadenamiento. En primer lugar es necesario establecer la direccionalidad de la molécula y a continuación tratar de superponer las hebras realizando para ello el giro con el menor ángulo posible. Si ese giro es a favor de las agujas del reloj, se dice que el cruce es dextrógiro y el signo es negativo; si el giro va en contra de las agujas del reloj, es levógiro y el signo del cruce es positivo (Schvartzman and Stasiak, 2004; Bates and Maxwell, 2005). El signo de un cruce en el DNA puede determinarse mediante técnicas de microscopía tal y como se verá más adelante.

En 1976 James Wang y colaboradores fueron los primeros en observar nudos en moléculas de DNA circular de cadena sencilla del bacteriófago fd tratadas con una proteína de *E. coli* entonces llamada ω y que luego resultó ser la Topo I (Liu et al., 1976). Posteriormente, se observó la formación de nudos en DNA de doble cadena por parte de la topoisomerasa de tipo II del fago T4 (Liu et al., 1980) y de la DNA topoisomerasa II de *Drosophila* (Hsieh, 1983). Además, se demostró que la Topo I de *E. coli* es capaz de formar nudos también en DNA de doble cadena, siempre y cuando éste tenga una pequeña región de cadena sencilla (Brown and Cozzarelli, 1981; Dean and Cozzarelli, 1985; Dean et al., 1985). Asimismo, otros estudios *in vitro* demostraron la formación de nudos en DNA de doble cadena por parte de enzimas implicadas en procesos de recombinación, como la resolvasa Tn3 (Wasserman and Cozzarelli, 1985; Wasserman et al., 1985), codificada en el transposon del mismo nombre en bacterias, y la integrasa Int del bacteriófago λ (Griffith and Nash, 1985; Spengler et al., 1985).

En cuanto al anudamiento *in vivo*, se observó la formación de nudos de manera natural en el DNA de doble cadena de la cápside de los bacteriófagos P2 y P4 (Liu et al., 1981a; Liu et al., 1981b). No obstante, la información sobre el anudamiento del DNA *in vivo* sigue siendo escasa; de ahí que resultara sorprendente el descubrimiento de plásmidos bacterianos con horquillas de replicación detenidas y anudadas. Los RIs con burbujas anudadas fueron en principio descritos en plásmidos de *E. coli* con dos orígenes de replicación ColE1 enfrentados y en plásmidos con un origen de replicación ColE1 y una

barrera para el progreso de la horquilla de replicación (Viguera et al., 1996; Sogo et al., 1999; Santamaría et al., 2000a; Santamaría et al., 2000b; Olavarrieta et al., 2002a; Olavarrieta et al., 2002b). Aún hoy día se desconoce con exactitud qué papel juega el anudamiento durante la replicación. En *E. coli* se sabe que la Topo IV es la topoisomerasa encargada de desanudar el DNA *in vivo* (Deibler et al., 2001).

1.6. Encadenamiento del DNA.

En topología del DNA, el término encadenado alude a la unión topológica de dos o más moléculas circulares de DNA, entrelazadas como si se de eslabones de una cadena se tratasen.

El DNA encadenado ha sido descubierto en diversos sistemas biológicos tanto procariotas como eucariotas. En 1967 se observaron por primera vez, mediante microscopía electrónica, moléculas encadenadas de DNA en mitocondrias de células humanas (Clayton and Vinograd, 1967; Hudson and Vinograd, 1967). Posteriormente se encontraron también encadenados en mitocondrias de tripanosomas cuyo DNA es una estructura compacta, denominada cinetoplasto (*kinetoplast* DNA; kDNA), que consiste en cientos de moléculas encadenadas (Englund et al., 1982). Por otro lado, se ha demostrado la aparición de encadenados como productos o como intermediarios en procesos de recombinación (Mizuuchi et al., 1980) así como la formación y resolución de encadenados *in vitro* (Kreuzer and Cozzarelli, 1980). Pero sin duda lo más común es que los encadenados aparezcan como intermediarios o como producto final de la replicación de moléculas de DNA circulares; de hecho, la formación de encadenados es una de las consecuencias topológicas de la replicación de ese tipo de moléculas. En este sentido, se han observado encadenados en el DNA del virus SV40 (Jaenisch and Levine, 1973; Sundin and Varshavsky, 1980, 1981), pero fundamentalmente se han estudiado en plásmidos bacterianos (Kupersztoch and Helinski, 1973; Novick et al., 1973; Sakakibara et al., 1976).

Existen tres tipos de encadenados: de tipo A o Cat A, en los que las dos moléculas de DNA circular están niqueadas y, por tanto, relajadas (ambas son OCs); Cat B en donde

sólo una de las dos moléculas está niqueada (OC), mientras que la otra está covalentemente cerrada y puede albergar ΔW_r ; y Cat C, en los que ambas moléculas encadenadas están covalentemente cerradas, pudiendo albergar ΔW_r . Estos últimos son el tipo de encadenado más abundante *in vivo*. Además, existen dos parámetros topológicos para definir los encadenados: el parámetro n , que es el número de cruces que presentan las moléculas encadenadas al proyectarlas sobre el plano; y el número de encadenamiento, C_a , cuyo valor es siempre la mitad del número de cruces.

La gran cantidad de encadenados con alto C_a que se acumulan al inhibir la topoisomerasas de tipo II pone en evidencia que son éstas las encargadas de eliminar el encadenamiento en el DNA (Adams et al., 1992; Peng and Mariani, 1993; Hiasa and Mariani, 1996; Levine et al., 1998; Lucas et al., 2001). En *E. coli* la Topo IV desencadena el DNA *in vivo* (Zechiedrich and Cozzarelli, 1995; Zechiedrich et al., 1997) y recientemente se ha demostrado que el ΔW_r (-) ayuda al desencadenamiento por parte de esta enzima (Martinez-Robles et al., 2009; Vologodskii, 2010). En *S. cerevisiae* la encargada de desencadenar es la Top2 (DiNardo et al., 1984; Holm et al., 1985).

1.7. Métodos de análisis de moléculas de DNA con distintas formas topológicas.

La centrifugación en gradientes de densidad fue uno de los primeros métodos empleados para el análisis de moléculas de DNA con distintas formas topológicas (Vinograd et al., 1965). Más tarde, este método fue reemplazado por la electroforesis en geles de agarosa por tratarse de una técnica más versátil que permite diferenciar moléculas superenrolladas, así como encadenadas y/o anudadas con distinto número de cruces (Sundin and Varshavsky, 1980, 1981; Shishido et al., 1987; Shishido et al., 1989; Stasiak et al., 1996; Vologodskii et al., 1998). Para el estudio de moléculas individuales, una de las técnicas preferidas es la microscopía electrónica. En este sentido cabe destacar el recubrimiento del DNA con la proteína RecA que mejora significativamente la visualización de nudos y encadenados. Con dicho recubrimiento se consigue un engrosamiento del DNA que permite determinar el signo de cada cruce en moléculas superenrolladas, encadenadas y/o anudadas (Stasiak et al., 1981; Di Capua et al., 1982;

Stasiak and Di Capua, 1982; Krasnow et al., 1983; Sogo et al., 1986; Sogo et al., 1999). Más recientemente también se han obtenido imágenes de alta resolución de DNA encadenado mediante microscopía de fuerza atómica (Yamaguchi et al., 2000).

Finalmente, merece especial atención la electroforesis bidimensional en geles de agarosa que es la única que permite la identificación simultánea de todos los topoisómeros de una población (Martin-Parras et al., 1998).

1.7.1. Análisis de RIs mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa.

Esta técnica fue utilizada originalmente para separar intermediarios de recombinación ramificados de moléculas lineales (Bell and Byers, 1983) y posteriormente fue adaptada para analizar RIs lineales (Brewer and Fangman, 1987). Hoy día la electroforesis bidimensional en geles de agarosa es una de las herramientas más frecuentemente empleadas en el mapeo de orígenes de replicación (Brewer and Fangman, 1987; Gahn and Schildkraut, 1989; Schvartzman et al., 1990; Vaughn et al., 1990; Martín-Parras et al., 1991; Friedman and Brewer, 1995; Bach et al., 2003), términos (Zhu et al., 1992; Santamaría et al., 2000a; Santamaría et al., 2000b) y barreras para el progreso de las horquillas (Brewer and Fangman, 1988; Linskens and Huberman, 1988; Hernández et al., 1993; Little et al., 1993; Wiesendanger et al., 1994). Además, permite resolver las distintas formas topológicas que pueden adoptar los CCCs (Schvartzman et al., 1990; Martín-Parras et al., 1991; Hanai and Roca, 1999; Lucas et al., 2001) y ha demostrado ser la herramienta más idónea para la identificación de moléculas de DNA lineales con una burbuja interna anudada (Viguera et al., 1996; Sogo et al., 1999; Santamaría et al., 2000b). La posibilidad de añadir un agente intercalante durante la primera y/o la segunda dimensión aumenta aún más su poder de resolución (Martin-Parras et al., 1998).

La electroforesis bidimensional en geles de agarosa se basa en que la movilidad electroforética de una molécula de DNA en un gel de agarosa depende no sólo del tamaño del fragmento analizado sino también de su forma, de la concentración de agarosa presente en el gel y de la fuerza del campo eléctrico al que se somete la molécula. Ajustando todos

estos parámetros, es posible separar los RIs y el resto de moléculas de DNA ramificadas de las moléculas no replicadas. En líneas generales, en un gel bidimensional la primera dimensión transcurre en condiciones de bajo voltaje y bajo porcentaje de agarosa en el gel. En estas condiciones se minimiza el efecto de la estructura tridimensional de los RIs sobre su movilidad electroforética y las moléculas se separan fundamentalmente en función de su masa. En cambio, la segunda dimensión transcurre en condiciones de alto voltaje y alto porcentaje de agarosa potenciando así la influencia de la estructura tridimensional de las moléculas sobre su movilidad. En estas condiciones, las moléculas ramificadas tienen menor movilidad que las moléculas lineales de igual masa. De esta forma, es posible analizar mezclas de poblaciones de moléculas con distintas masas y formas.

1.8. Algunos problemas no resueltos de la topología de los RIs.

En procariotas, la confirmación de que los cambios en el nivel de W_r generados como consecuencia del avance de la horquilla de replicación afectan tanto a la región no replicada como a la ya replicada de los RIs (Champoux and Been, 1980; Peter et al., 1998) resolvió lo que hasta entonces era una paradoja. No obstante, parte de la dinámica del proceso es aún desconocida. Por ejemplo, se desconocen los efectos de la eliminación selectiva del W_r en la región replicada o en la no replicada de los RIs. Otro problema que aún permanece sin resolver es el origen del anudamiento en los RIs, la enzima responsable de la formación de esos nudos y el papel de los mismos durante la replicación.

En las células eucariotas, se sabe que la Top2 elimina completamente el encadenamiento entre cromátidas hermanas antes de que éstas sean segregadas durante la división celular (DiNardo et al., 1984; Holm et al., 1985). Sin embargo, todavía persisten muchos interrogantes acerca de cómo tiene lugar ese proceso en la totalidad del genoma de la célula. Además aún queda por esclarecer la relación entre ese desencadenamiento y el resto de cambios topológicos que acontecen en el DNA a lo largo del ciclo celular.

Estos son algunos de los problemas que nos hemos propuesto resolver a lo largo de la presente Tesis Doctoral. Para ello, en el caso de procariotas, decidimos estudiar la

topología de los RIs construyendo plásmidos de replicación autónoma derivados de pBR322 en los que las horquillas se detienen en un sitio concreto. En estos plásmidos, la replicación se inicia en el origen unidireccional ColE1 y la horquilla se detiene debido a la presencia de la secuencia terminadora de la replicación *TerE*, de *E. coli*, en la orientación adecuada. La proteína Tus (de *Terminator utilization substance*) se une a las secuencias *Ter* en forma monomérica y los complejos *Ter*-Tus actúan como barreras polares para el progreso de las horquillas de replicación (Hill, 1992; Bastia and Mohanty, 1996). Así pues, en las células se acumularán plásmidos parcialmente replicados y el análisis de los mismos (intactos o digeridos con endonucleasas de restricción) por electroforesis bidimensional en geles de agarosa nos permitirá conocer sus propiedades topológicas e indagar acerca de la formación de nudos entre las cromátidas hermanas.

En cuanto al estudio del ΔW_r y el desencadenamiento de cromátidas hermanas en eucariotas, empleamos como modelo el minicromosoma pRS316 de *S. cerevisiae*. Los minicromosomas son moléculas extracromosómicas de DNA circular de pequeño tamaño que reciben ese nombre porque se comportan como el DNA cromosómico, tanto a nivel físico (empaquetamiento nucleosomal y unión de cohesinas), como a nivel bioquímico (interacción con proteínas reguladoras) y biológico (procesos metabólicos tales como replicación, transcripción, reparación y recombinación). Estas características hacen que los minicromosomas sean utilizados muy a menudo como modelos para el estudio de procesos complejos. Además, empleando un sistema de degron inducible por temperatura (Dohmen et al., 1994) podremos analizar las consecuencias de la eliminación de la Top2 sobre la topología de los RIs de pRS316. Un degron es una secuencia específica de aminoácidos en una proteína que actúa como una señal para la degradación de la misma. La fusión de la proteína Top2 con un degron inducible por temperatura, en su extremo N-terminal, permite la degradación regulable de la misma. El degron es, a su vez, una proteína de fusión compuesta por ubiquitina y Arg-DHFR^{ts}, una variante termosensible de la dihidrofolato reductasa de ratón en la que el residuo amino-terminal de valina ha sido sustituido por una arginina (R) que es un residuo desestabilizador. De manera que la proteína de fusión Top2td resultante está compuesta por un motivo ubiquitina (Ubi) N-terminal, un motivo DHFR^{ts} con un residuo desestabilizador (R) en la unión con el motivo ubiquitina, y la proteína Top2 en el extremo C-terminal, tal y como se indica en la figura 3.

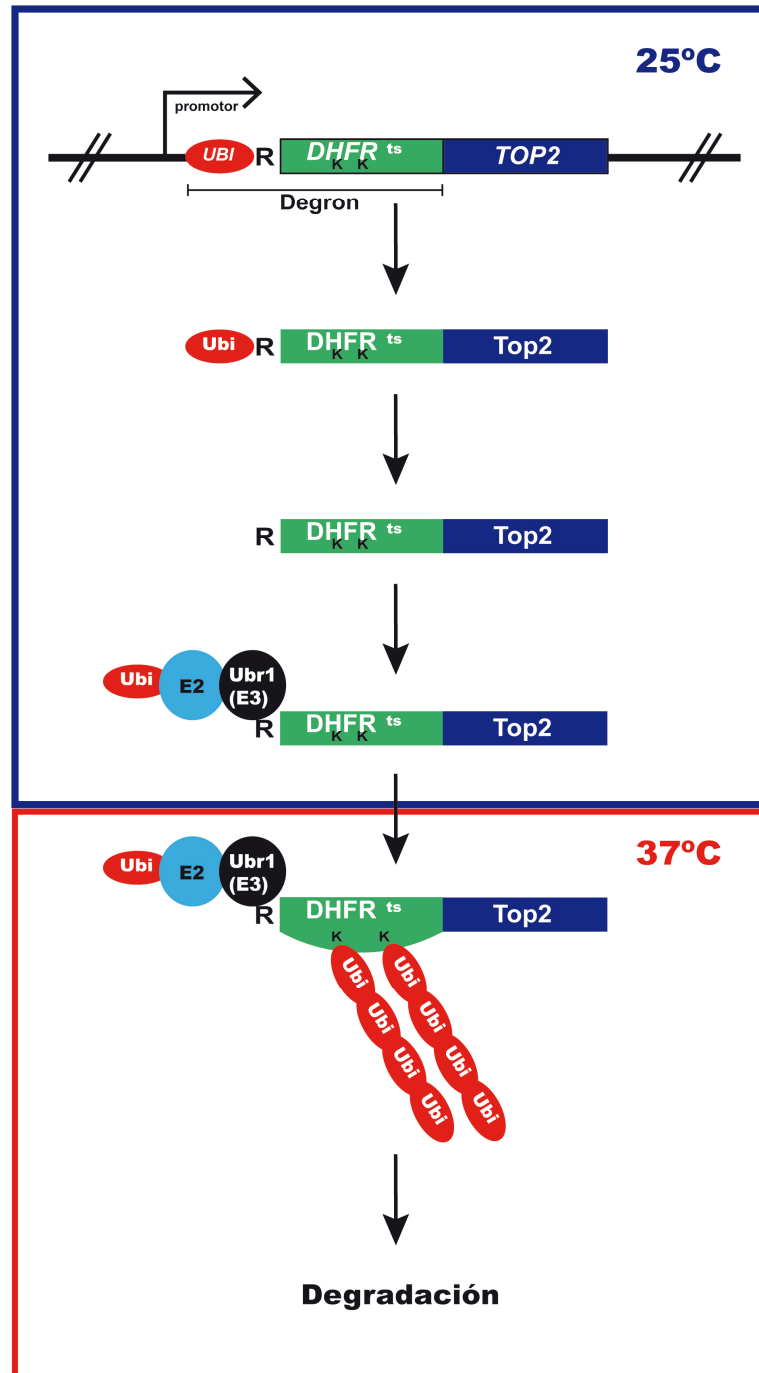


Figura 3. Esquema de la estructura y modo de acción del degon inducible por temperatura. En la parte superior se representa la estructura del cassette degen fusionado con el gen *TOP2*. Una vez que dicho gen se transcribe, la proteína de fusión resultante, Top2td, está compuesta por un motivo ubiquitina (*Ubi*) N-terminal, un motivo *DHFR^{ts}* con un residuo de arginina (*R*) desestabilizador y la proteína Top2 en el extremo C-terminal. Su expresión en *S. cerevisiae* conduce al corte de la unión *Ubi*-*DHFR^{ts}* y la consiguiente exposición del residuo *R*. A ese residuo se unen, de forma reversible, la Ubiquitina ligasa (*Ubr1*, E3) y el complejo *Ubi*-E2. A la temperatura restrictiva (37°C) la *DHFR^{ts}* se despliega y expone residuos internos de lisina (*K*) que actúan como sitios de poliubiquitinación, lo que conduce a una rápida degradación de Top2td por parte del proteasoma.

La expresión de esa proteína de fusión en *S. cerevisiae* conduce rápidamente al corte de la unión Ubiquitina-DHFR y la consiguiente exposición del residuo de arginina en el extremo N-terminal de la fusión. A ese residuo se unirá, de forma reversible, la Ubiquitina ligasa (Ubr1, E3) y, a su vez, el complejo Ubiquitina-E2. No obstante, a la temperatura permisiva (25°C) el N-degron es inactivo porque ninguno de los residuos internos de lisina (K) en la DHFR^{ts} plegada puede actuar como sitio eficaz de poliubiquitinación. Sin embargo, a la temperatura restrictiva (37°C) se produce un cambio conformacional haciendo que se despliegue, al menos parcialmente, y que algunos de sus residuos internos de lisina pasen a estar disponibles como sitios de poliubiquitinación en este N-degron antes oculto. A esas lisinas se une el complejo Ubiquitina-E2. Se produce entonces la poliubiquitinación de la Top2td, que pasa a ser reconocida por el proteasoma donde es degradada con una alta procesividad.

En resumen, en la presente Tesis Doctoral hemos estudiado, en procariotas, el anudamiento que se produce durante la replicación del DNA y, en eucariotas, el papel del ΔWt en el desencadenamiento de las cromátidas hermanas por parte de la Top2.

2. OBJETIVOS

1. Construir plásmidos derivados de pBR322 con una barrera polar para el avance de la horquilla de replicación a distintas distancias del origen y estudiar la topología de los RIs de estos plásmidos crecidos en *E. coli*.
2. Estudiar el efecto de roturas de cadena sencilla en la región replicada y no replicada de los RIs.
3. Analizar la topología de moléculas con la horquilla detenida mediante microscopía de fuerza atómica.
4. Identificar la enzima responsable del anudamiento de las cromátidas hermanas durante la replicación.
5. Determinar los mecanismos que favorecen la formación de nudos inter- e intra-cromatídicos durante la replicación.
6. Estudiar los cambios topológicos que tienen lugar a lo largo del ciclo celular en un minicromosoma circular de *S. cerevisiae*.
7. Analizar el papel de la Top2 en el desencadenamiento de las cromátidas hermanas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico y medios de cultivo.

3.1.1. Material biológico.

Las estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo fueron:

DH5 α F': [F'/ *endA1 hsdR17* (r_k^- , m_k^+) *supE44 thi-1 λ^- recA1 gyrA96* (nal^I) *relA1 deoR* $\Delta(lacZYA-argF)$ -U169 $\phi 80dlacZ\Delta M15$].

W3110: [F⁻], (Kato et al., 1990). Cedida por la Dra. Lynn Zechiedrich.

parE10: W3110 [*parE10 recA*], (Kato et al., 1990). Cedida por el Dr. Ian Grainge.

C600parC1215: [F⁻ *thr-1 leu-6 thi-1 lacY1 supE44 tonA21 parC1215 met::Tn10*], (Kato et al., 1988). Cedida por el Dr. Kent Marians.

DS941: AB1157 (Dewitt and Adelberg, 1962) [*recF143 lacI^q lacZ* Δ M15] (Summers and Sherratt, 1988).

DS9038: DS941 (Bigot et al., 2004)[*xerC::gen*], cedida por el Dr. Ian Grainge.

DS9039: DS941(Aussel et al., 2002)[*xerD::kan*], cedida por el Dr. Ian Grainge.

MG1655: [F- λ^- *ilvG- rfb-50 rph-1*], (Guyer et al., 1981).

N4971: MG1655 [Δ *recG263::kan Δ ruvABC::cat*], (Briggs et al., 2005). Cedida por el Dr. Robert G. Lloyd.

N5070: MG1655 [Δ *recG263::kan Δ ruvABC::cat recA269::Tn10*], (Gregg et al., 2002). Cedida por el Dr. Robert G. Lloyd.

Todas las estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas se basaron en la estirpe W303-1a (*MATa ade2-1 ura 3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3 can1-100*) modificada (estirpe YST114) para usarla con el degenon inducible por temperatura (Dohmen et al., 1994). En todos los experimentos la estirpe silvestre fue YST114 (Tanaka and Diffley, 2002; Baxter and Diffley, 2008). El genotipo se detalla a continuación:

YST114: W303-1a *UBR1::pGAL-myc-UBR1 (HIS3) leu2::pCM244x3*.

top2-td: YST114 *kanMX-tTA-tetO2-UB-DHFRts-myc-top2*.

cdc20-td: YST114 *kanMX-tTA-tetO2-UB-DHFRts-myc-cdc20*.

top2-td cdc20-td: YST114 *kanMX-tTA-tetO2-UB-DHFRts-myc-top2 kanMX-tTA-tetO2-UB-DHFRts-myc-cdc20*.

smc2-8 top2-td: YST114 *kanMX-tTA-tetO2-UB-DHFRts-myc-top2 smc2-8 TRP1*.

3.1.2. Medios y cultivo de *E. coli*.

Los cultivos en medio líquido de las distintas estirpes se realizaron en LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, cloruro sódico 1%, pH 7.5) a 37°C con agitación orbital (250 rpm). Para la selección de transformantes se utilizó ampicilina (Roche) a 75µg/ml, tetraciclina a 12.5 µg/ml (Sigma) o cloranfenicol (Sigma) a 30 µg/ml.

La inhibición de la Topo IV en las estirpes parE10 y C600parC1215 (con mutaciones termosensibles en los genes *parE* o *parC*, respectivamente) se llevó a cabo creciendo los cultivos a la temperatura permisiva (30°C) hasta alcanzar la fase exponencial e incubándolos después a la temperatura restrictiva a distintos tiempos y con agitación orbital.

La densidad celular en los cultivos se determinó midiendo la densidad óptica en un espectrofotómetro a 600 nm (OD_{600}) frente a un blanco que contenía el medio LB sin células bacterianas.

Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas Petri con LB al que se añadió agar al 2%. Las placas se incubaron invertidas entre 16 y 18 horas a 37°C en estufa.

Todas las estirpes bacterianas se conservaron diluidas al 50% en una solución de glicerol (glicerol 65%, $MgSO_4$ 0.1 M, Tris-HCl 0.025 M, pH8.0) a -20°C y a -80°C.

3.1.3. Medios y cultivo de *S. cerevisiae*.

Para la selección por auxotrofia las estirpes de *S. cerevisiae* transformadas con el minicromosoma pRS316 se crecieron rutinariamente a la temperatura permisiva de 25°C con agitación orbital en medio selectivo SC (*Synthetic Complete*) : bases nitrogenadas de levaduras sin aminoácidos (YNB) 0.7%, rafinosa 2% y mezcla completa de aminoácidos excepto uracilo, a pH 6.8.

Para sincronizar los cultivos las células se crecieron en medio YPDA: medio YP (extracto de levadura 1%, bactopectona 2%) suplementado con adenina a 0.1 mg/ml y glucosa, galactosa o rafinosa a una concentración final del 2%, a pH 5.0.

Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas Petri con el medio correspondiente, al que se añadió agar al 2%. Las placas se incubaron invertidas entre 2 y 12 días a 25°C en estufa.

Las estirpes de levaduras se conservaron en glicerol al 15% a -80°C.

3.1.3.1. Sincronización de cultivos de *S. cerevisiae*.

La sincronización de cultivos en crecimiento exponencial previa al aislamiento del DNA replicativo del plásmido pRS316 se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Linda Breeden (Breeden, 1997), incluyendo algunas modificaciones.

Todas las estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas fueron células haploides del tipo sexual **a** y por tanto con una respuesta normal a la feromona α -factor (Trp-His-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Met-Tyr) que provoca una parada en la fase G1 del ciclo celular.

Crecimos la estirpe top2-td en medio selectivo sin uracilo (SC, rafinosa 2%, ura-), para mantener la selección del plásmido pRS316 (*URA3*), a 25°C con agitación orbital (250 rpm) hasta fase exponencial. Seguidamente, pasamos las células a medio YPDA (rafinosa 2%) hasta que el cultivo alcanzó la fase exponencial (aproximadamente 1×10^7 células/ml). En este punto se pararon las células en G1 añadiendo al cultivo α -factor (Sigma) a una concentración final de 5 μ g/ml. Tras 100-120 minutos de incubación a 25°C con agitación orbital comprobamos en un microscopio de contraste de fases que más del 90% de células presentaban la morfología *schmoo* (células sin gema, alargadas y con el núcleo también alargado) característica del bloqueo en G1 causado por α -factor. A continuación, añadimos galactosa al 2% para expresar la Ubiquitina ligasa (Ubr1, E3) que ubiquitinará a la Top2 fusionada con el degron, y doxiciclina (Sigma) a una concentración final de 50 μ g/ml, para reprimir el promotor del gen *TOP2*. Seguidamente pasamos el cultivo a la temperatura restrictiva de 37°C durante 1 hora para inducir el degron de manera que la Top2 fuese ubiquitinada y degradada por el proteasoma. Tras esa hora las células se liberaron del bloqueo centrifugándolas a 4000 rpm, durante 2 minutos a temperatura ambiente y lavándolas cuatro veces con medio YPDA (rafinosa 2%, galactosa 2%) con doxiciclina (50 μ g/ml) atemperado a 37°C. Finalmente, se pasaron a un matraz con este mismo medio y con objeto de analizar los RIs de pRS316 recogimos alícuotas de 50 ml de cultivo (aproximadamente 1×10^9 células/pellet) cada 20 minutos a lo largo de 120 minutos de incubación a 37°C (tomando el tiempo 0 como el momento del primer lavado), centrifugando a 4000 rpm, durante 2 minutos a temperatura ambiente y lavando los pellets

con agua destilada estéril. Asimismo, recogimos alícuotas de 500 μ L de cultivo para su posterior análisis mediante citometría de flujo.

Para el bloqueo con nocodazol (Sigma), un agente antimitótico que inhibe la polimerización de los microtúbulos, dejamos que las células replicaran su DNA en presencia de actividad Top2 antes de bloquearlas en metafase mediante el tratamiento con nocodazol. Así pues, en primer lugar las células se sincronizaron con α -factor en medio YPDA (rafinosa 2%) a 25°C y se liberaron del bloqueo en medio YPDA (rafinosa 2%, galactosa 2%) con nocodazol a una concentración final de 10 μ g/ml. Tras 90 minutos de incubación a 25°C, comprobamos en un microscopio de contraste de fases que las células presentaban la morfología característica del bloqueo en mitosis causado por el nocodazol (>80% con gema). A continuación, añadimos doxiciclina a una concentración de 50 μ g/ml y pasamos el cultivo a la temperatura restrictiva de 37°C durante 1 hora en nocodazol. Después lavamos el nocodazol e incubamos las células en medio YPDA (rafinosa 2%, galactosa 2%) con doxiciclina (50 μ g/ml) a 37°C. Se recogieron alícuotas de ese cultivo en los tiempos indicados anteriormente.

La estirpe con el doble degron, top2-td cdc20-td, se bloqueó en G1 con α -factor y tanto Cdc20 como Top2 fueron degradadas al pasar el cultivo a la temperatura restrictiva (37°C). La degradación de Cdc20 (proteína activadora del complejo promotor de la anafase, APC) provocó el bloqueo de las células en metafase. Las células se liberaron del bloqueo, progresando entonces de manera sincrónica en el ciclo celular en medio con o sin nocodazol.

3.2. Reactivos, enzimas y oligonucleótidos.

3.2.1. Reactivos.

Las sales, ácidos, bases inorgánicas y compuestos orgánicos componentes de los medios de cultivo y de todas las soluciones empleadas proceden de las firmas AppliChem,

Becton-Dickinson, Genomed, Merck, MP Biomedicals, Panreac, Perkin-Elmer, Qiagen, Roche Applied Science y Sigma-Aldrich.

Para sincronizar los cultivos de *S. cerevisiae* empleamos α -factor, suministrado por Sigma, a una concentración final de 5 μ g/ml.

Para romper la pared celular de las levaduras utilizamos esferas de vidrio de 0.5 mm de diámetro (*Glass beads* BioSpec Products, Inc.).

En los geles unidimensionales empleamos agarosa D1 media EEO de Pronadisa y en los bidimensionales la agarosa SeaKem LE (Lonza).

Para la extracción de RIs de geles de agarosa se usó agarosa de bajo punto de fusión (*Certified Low Melt Agarose*) de Bio-Rad.

Los tampones de electroforesis empleados (TBE, TAE, TE, etc.) se prepararon según Sambrook y colaboradores (Sambrook et al., 1989).

3.2.2. Enzimas.

Las enzimas de restricción fueron suministradas por Fermentas, New England Biolabs y Roche Applied Science.

Para el estudio de burbujas anudadas empleamos la endonucleasa de restricción *AlwNI* (New England Biolabs).

Los cortes de cadena sencilla en los RIs se realizaron mediante endonucleasas de restricción de cadena sencilla. Sus secuencias de reconocimiento son idénticas a las de las endonucleasas de restricción de las que derivan, pero hidrolizan sólo una de las dos hebras del DNA y se denominan *Nt.* o *Nb.* seguido del nombre de la enzima según la hebra hidrolizada sea la de sentido 5'→3' o 3'→5', respectivamente. En este trabajo se

emplearon: *Nb.BsmI*, *Nb.BtsI*, *Nt.BbvCI* (suministradas por New England Biolabs) y *Nt.Bpu10I* (suministrada por Fermentas).

Para la digestión en gel entre la primera y la segunda dimensión se usó *EcoRI* (Roche).

Otras enzimas utilizadas fueron: lisozima (Sigma), RNasa A (Roche), proteinasa K (Roche), T4 polinucleótido kinasa (T4 PNK) (Roche), T4 DNA ligasa (Fermentas), fosfatasa alcalina de camarón boreal (SAP) (Roche), Pepsina (Sigma), β -Agarasa I (New England Biolabs), Topoisomerasa IV (Inspiralis).

3.2.3. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos fueron empleados para clonar la secuencia de reconocimiento de la endonucleasa de restricción *BbvCI* y también como cebadores para la secuenciación y confirmación de la integración de dicha secuencia en las distintas construcciones. Fueron suministrados por Roche y su secuencia se indica en sentido 5'→3':

512 (f) AAA TTC TCG GAG GCT GAG GTC ATG CTC GAG GAT CTT CAC
CTA GAT CCT TTT AAA TTA AAA ATG AAG TTT T

512 (r) AAA ACT TCA TTT TTA ATT TAA AAG GAT CTA GGT GAA GAT
CCT CGA GCA TGA CCT CAG CCT CCG AGA ATT T

3.3. Preparación de células de *E. coli* para su visualización mediante microscopía de epifluorescencia.

Primeramente, fijamos las células de los cultivos correspondientes con etanol al 70% y las conservamos a 4°C. Después, las centrifugamos y resuspendimos en agua destilada estéril. A continuación, depositamos sobre un portaobjetos 20 μ l de la muestra

correspondiente y, una vez seca, se tiñó el DNA con medio de montaje Vectashield conteniendo 4,6-diamino-2-fenilindil (DAPI) a una concentración de 1.5 µg/ml (Vector Labs). Finalmente colocamos el cubre, sellándolo con esmalte de uñas. Las muestras se examinaron bajo un objetivo de 40x y se fotografiaron en un microscopio de epifluorescencia Axioplan Universal de Zeiss equipado con una cámara CCD digital Leica DFC 350 FX.

3.4. Preparación de células de *S. cerevisiae* para su análisis mediante citometría de flujo.

Las muestras para el análisis mediante citometría de flujo (FACS, *Fluorescence-activated cell sorting*) se recogieron y procesaron siguiendo el protocolo de Labib y colaboradores (Labib et al., 1999) y se analizaron empleando el citómetro de flujo FACSCalibur de Becton Dickinson.

3.5. Construcción de plásmidos y minicromosomas.

En la construcción de todos los plásmidos de la serie pBR para la fosforilación de los oligonucleótidos empleamos T4 PNK (Roche) y para la desfosforilación de extremos 5'-fosforilados de DNA usamos la fostatasa alcalina SAP (Roche). La extracción de los fragmentos de DNA de geles unidimensionales de agarosa se realizó con el *QIAquick Gel Extraction Kit* de Qiagen. Las reacciones de ligación se realizaron con 6-9 ng de vector y una relación molar inserto: vector de 1:3 en presencia de 10 U de DNA Ligasa T4 (Fermentas) en un volumen final de 10-15 µL. Después de 16 horas de incubación a 18°C transformamos, con todo el volumen de reacción, las células competentes de la estirpe de *E. coli* correspondiente.

pBR18 (4383 bp): es un derivado de pBR322 (Bolívar et al., 1977) en donde el promotor del gen de resistencia a tetraciclina fue sustituido por la región *polylinker* de pUC18 (ver figura 4).

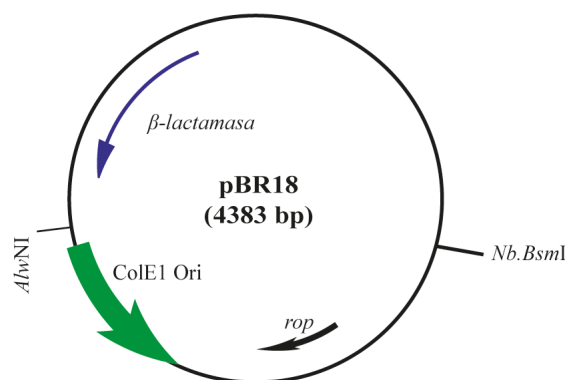


Figura 4. Mapa del plásmido pBR18. Sobre el mapa se indica la posición y orientación del origen unidireccional de replicación ColE1 (flecha verde). Los sitios de corte de las enzimas de restricción *AlwNI* y *Nb.BsmI* aparecen señalados sobre el mapa. En el interior se indican la posición y orientación del gen β -lactamasa, que confiere resistencia a ampicilina (flecha azul) y del gen *rop* (flecha negra) que codifica la proteína homodimérica de unión a RNA Rop (*repressor of primer*) implicada en la regulación del número de copias del plásmido.

pBR512n (3899 pb): es un derivado del plásmido pBR512 (construido por L. Olavarrieta) en cuyos sitios *DraI* se clonó un fragmento que contiene la secuencia de reconocimiento de la endonucleasa de restricción *BbvCI*.

pBR-TerE@*StyI* (4385 pb): es un derivado de pBR322-TerE@*StyI* construido por L. Olavarrieta (Olavarrieta et al., 2002a). Contiene la secuencia terminadora de la replicación *TerE* del cromosoma de *E. coli* entre los sitios *StyI* y *AvaI* de pBR322, en la orientación adecuada para bloquear el progreso de las horquillas de replicación que se inician en el origen unidireccional ColE1 del plásmido (Figura 5A). Esta estrategia permite obtener un número significativo de RIs con la horquilla replicación detenida en la secuencia *TerE*, cuando ha alcanzado el 26% de su replicación. De este modo los RIs acumulados contienen una burbuja interna y su masa es 1.26 veces la masa del plásmido no replicado, tal y como se muestra en la figura 5B.

Entre los sitios *PvuII* y *PstI* se clonó el fragmento de pBR512n conteniendo el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *BbvCI* y a este plásmido se le denominó pBR-TerE@*StyI*.

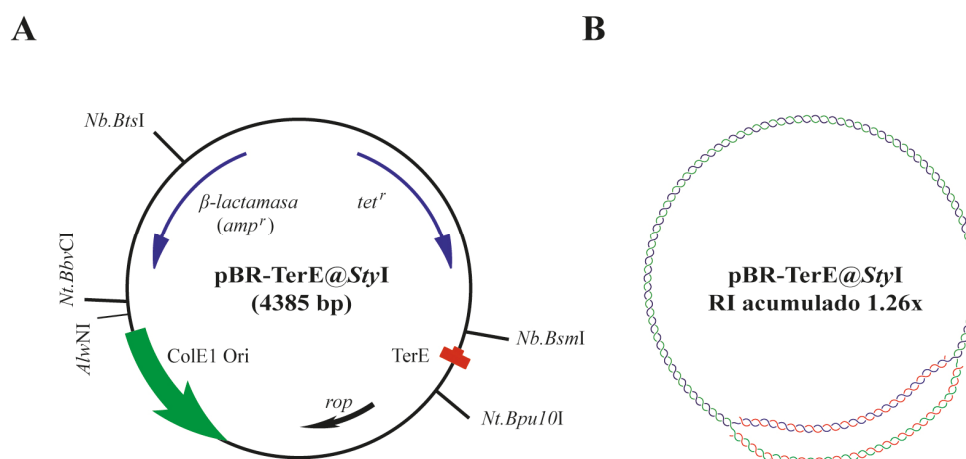


Figura 5. Mapa del plásmido pBR-TerE@StyI. **A:** Mapa sobre el que se indica la posición y orientación del origen unidireccional de replicación ColE1 (flecha verde) y del terminador polar de la replicación *TerE* (en color rojo). Se señalan además los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas. En el interior se indican la posición y orientación del gen β -lactamasa, que confiere resistencia a ampicilina (flecha azul a la izquierda), del gen que confiere resistencia a tetraciclina (*tet^r*) (flecha azul a la derecha), y del gen *rop* (flecha negra) que codifica la proteína homodimérica de unión a RNA Rop (*repressor of primer*) implicada en la regulación del número de copias del plásmido. **B:** Esquema del RI que se acumula cuando la horquilla de replicación se detiene al llegar a la secuencia *TerE*. La doble hélice parental se representa con los colores azul y verde y las cadenas nacientes en color rojo.

pBR-TerE@AatII (4449 pb): es un derivado de pBR322-TerE@AatII construido por L. Olavarrieta (Olavarrieta et al., 2002a). Contiene la secuencia terminadora de la replicación *TerE* en el sitio *AatII* de pBR322 (Figura 6A).

Debido a la posición del terminador respecto al origen, en este plásmido se acumulan RIs con la horquilla detenida cuando ha alcanzado el 60% de su replicación. Por tanto, los RIs acumulados contienen una burbuja interna y su masa es 1.60 veces la masa del plásmido no replicado (Figura 6B).

Entre los sitios *ClaI* y *PstI* de este pBR322-TerE@AatII se clonó el fragmento de pBR512n que contiene el sitio *BbvCI* y se el nuevo plásmido se denominó pBR-TerE@AatII.

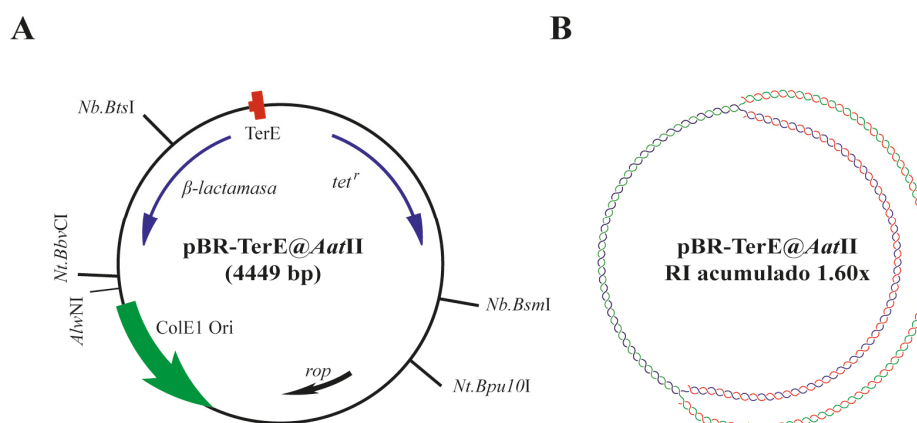


Figura 6. Mapa del plásmido pBR-TerE@AatII. **A:** Mapa en donde se indica la posición y orientación del origen ColE1 (flecha verde) y del terminador *TerE* (en rojo) así como los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas. En el interior del mapa se muestra la posición y orientación los genes que confieren resistencia a ampicilina (flecha azul a la izquierda) y tetraciclina (flecha azul a la derecha), y del gen *rop* (flecha negra). **B:** Esquema del RI que se acumula cuando la horquilla se detiene al llegar al terminador. En azul y verde se representa la doble hélice parental y en rojo las cadenas nacientes.

pBR-TerE@DraI (4433 pb): es un derivado de pBR322-TerE@DraI (construido por M.L. Martínez-Robles). Contiene el terminador *TerE* entre los sitios *DraI* y *XhoI* de pBR322, en la orientación adecuada para bloquear el progreso de las horquillas de replicación que se inician en el origen unidireccional ColE1 del plásmido (Figura 7A).

En este plásmido la horquilla se detiene cuando los RIs han alcanzado un 80% de su replicación; de manera que dichos RIs contienen una burbuja interna y su masa es 1.80 veces la masa del plásmido no replicado, tal y como se muestra en la figura 7B.

Entre los sitios *XhoI* y *StyI* se clonó el fragmento de pBR512n conteniendo el sitio *BbvCI* y se denominó a este plásmido pBR-TerE@DraI.

Utilizamos estas construcciones para transformar células de distintas estirpes de *E. coli* que cultivamos en presencia del antibiótico correspondiente. De esos cultivos en crecimiento exponencial se extrajo el DNA plasmídico tal y como se describe en el apartado 3.8.1 .

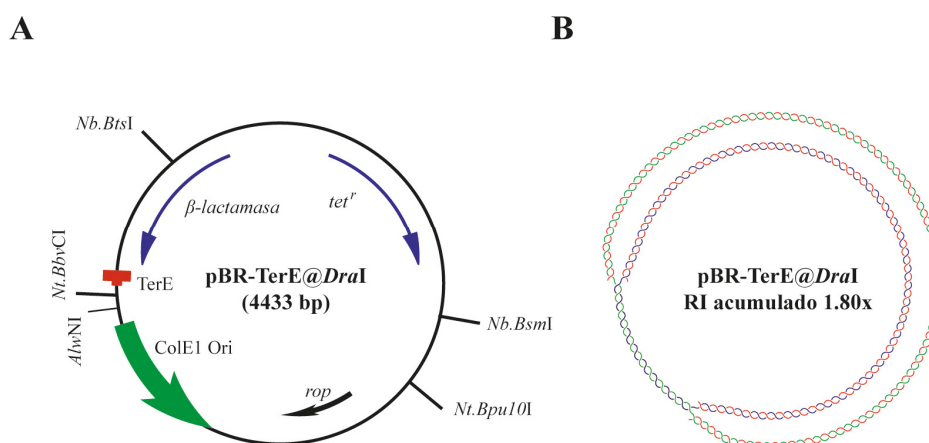


Figura 7. Mapa del plásmido pBR-TerE@DraI. **A:** Mapa del plásmido sobre el que se indica la posición y orientación del origen de replicación ColE1 (flecha verde) y del terminador (en color rojo), así como los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo. En el interior se indican la posición y orientación de los genes que confieren resistencia a ampicilina y tetraciclina (flechas azules a la izquierda y a la derecha, respectivamente), y del gen *rop* (flecha negra). **B:** Esquema del RI que se acumula cuando la horquilla de replicación se detiene al llegar a la secuencia *TerE*. En la representación de la doble hélice parental y de las cadenas nacientes se sigue el mismo patrón de color que en esquemas anteriores.

Minicromosoma pBRS316 (4887 bp): es un derivado de pRS306 (YIp) al que se le han añadido las secuencias centroméricas CEN6 y el origen de replicación ARSH4 (*Autonomous replication sequence*) para su estabilidad mitótica en *S. cerevisiae* (Sikorski and Hieter, 1989). En el sitio *NdeI* posee un inserto de 1112 kb que contiene el gen *URA3* (ver figura 8).

El examen de este plásmido a lo largo del ciclo celular sirvió para estudiar, entre otros, el efecto de la depleción de Top2 en la topología del DNA.

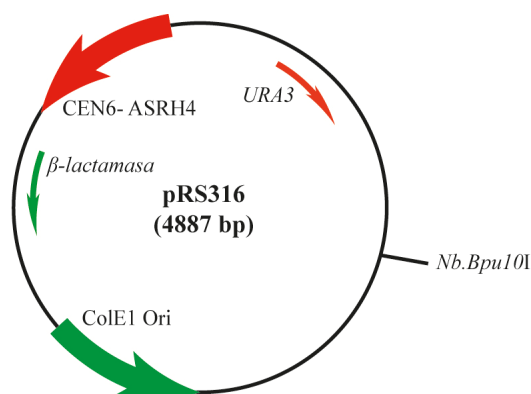


Figura 8. Mapa del minicromosoma pRS316. Sobre el mapa se indica con una flecha verde la posición y orientación del origen ColE1, para la replicación en *E. coli*. Con flecha roja se indica la posición y orientación de la secuencia de replicación autónoma asociada con la histona 4 (ARSH4), que funciona como origen para la replicación del plásmido en levaduras; así como la posición del centrómero (CEN6) que permite la segregación fiel del plásmido durante la división celular de la levaduras. Se indica además el sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción de cadena sencilla *Nt.Bpu10I*. En el interior del mapa se indican la posición y orientación de dos genes relevantes: el gen β -lactamasa (flecha verde), empleado para la selección en *E. coli* ya que confiere resistencia a ampicilina, y el gen *URA3* (flecha roja), que codifica una enzima para la síntesis de uracilo y sirve como marcador de selección en levaduras con la mutación *ura3*.

3.6. Transformación de *E. coli*.

La preparación de células de *E. coli* competentes y su posterior transformación se realizó según el método de cloruro de rubidio y choque térmico descrito por Hanahan (Hanahan, 1986).

3.7. Transformación de *S. cerevisiae*.

La transformación de células de *S. cerevisiae* se realizó según el método de acetato de litio descrito por Ausubel y colaboradores (Ausubel et al., 1995).

3.8. Preparación del DNA.

3.8.1. Extracción de DNA de *E. coli*.

3.8.1.1. Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*.

La extracción pequeña escala de DNA plasmídico de *E. coli* se realizó mediante el *QIAprep Spin Miniprep Kit* de Qiagen. Para la extracción a gran escala empleamos el *JETstar Plasmid Purification MAXI Kit* de Genomed.

3.8.1.2. Extracción de formas replicativas de DNA plasmídico de *E. coli*.

La extracción de DNA plasmídico enriquecido en RIs a partir de cultivos de *E. coli* en crecimiento exponencial se realizó siguiendo los protocolos descritos por Ausubel y colaboradores (Ausubel et al., 1995) y Martín-Parras y colaboradores (Martín-Parras et al., 1998).

3.8.2. Extracción de formas replicativas de DNA del minicromosoma pRS316 en *S. cerevisiae*.

Para la extracción de DNA replicativo del minicromosoma pRS316 en cultivos sincronizados de *S. cerevisiae* nos basamos en la técnica original de Huberman y colaboradores (Huberman, 1987) introduciendo algunas modificaciones.

Los cultivos sincrónicos de las estirpes a estudiar se crecieron hasta una concentración de 1×10^9 células/ml. Las células se recogieron por centrifugación a 4000 rpm, durante 2 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con agua destilada estéril para finalmente congelar el pellet a -80°C uno o más días. Las células se lavaron dos veces con agua destilada estéril fría centrifugando a 3000 rpm, durante 15 minutos a 4°C . A continuación, se resuspendieron las células en 500 μL de tampón NIB frío (*Nuclear Isolation Buffer*: glicerol 17%, MOPS 50 mM, acetato de potasio 150 mM, cloruro de magnesio 2 mM, pH 7.2, además de espermidina 500 μM y espermina 150 μM añadidas en el momento de su uso). La rotura mecánica de la pared celular se realizó en la cámara fría

añadiendo a las células en suspensión aproximadamente el mismo volumen de esferas de vidrio y alternando periodos de 30 segundos de agitación en vórtex, a velocidad máxima, con periodos de reposo del tubo en hielo de otros 30 segundos. Una vez comprobada la rotura de la pared celular (mediante el microscopio óptico, Zeiss) de alrededor del 90% de las células, se dejó que las esferas de vidrio se fueran depositando en el fondo del tubo por gravedad y se recogió el sobrenadante con los protoplastos con ayuda de una pipeta. Las esferas de vidrio se lavaron dos veces con dos volúmenes de NIB frío. Estos lavados se juntaron con el sobrenadante original y los protoplastos se recogieron por centrifugación a 8000 rpm, durante 10 minutos a 4°C en rotor de ángulo fijo. A continuación, se lisaron las células incubándolas durante 1 hora a 37°C en 500 µL de TEN₅₀₋₅₀₋₁₀₀ (Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8.0) conteniendo Sarkosyl NL-30 al 1.5% y proteinasa K a 300 µg/ml). Tras la incubación se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante. Para eliminar las proteínas, la muestra se trató con P-CIA 25:24:1 (fenol: cloroformo: alcohol isoamílico) varias veces (hasta que desapareció la interfase de color blanquecino) y una última vez con CIA 24:1 (cloroformo: alcohol isoamílico). El DNA se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol 100% frío, durante 16 horas a -20°C. Se centrifugó a 9000 rpm durante 1 hora a 4°C. Se lavó una vez con etanol al 70% frío y se centrifugó en las mismas condiciones pero durante 15 minutos. Finalmente, se dejó secar el pellet y se resuspendió a una concentración final de 3×10^7 células/µL en agua destilada estéril durante, al menos, 16 horas a 4°C.

3.9. Digestiones enzimáticas.

3.9.1. Digestión con la enzima de restricción *Al**w**N**I*.**

Para analizar las burbujas de replicación no anudadas y las anudadas en RIs de plásmidos con la horquilla detenida a distintas distancias del origen, llevamos a cabo la digestión con *A**l**w**N**I* (New England Biolabs) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

3.9.2. Digestiones con endonucleasas de restricción de cadena sencilla.

Las digestiones de cadena sencilla de las formas replicativas de pBR18, pBR-TerE@*StyI*, pBR-TerE@*AatII*, pBR-TerE@*DraI* y pRS316 se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones de las casas comerciales con las enzimas que se especifican a continuación:

Para la digestión de las formas replicativas de pBR18 se utilizó *Nb.BsmI*.

En pBR-TerE@*StyI* la introducción de roturas de cadena sencilla se llevó a cabo con *Nt.Bpu10I* en la región replicada y *Nb.BsmI* en la región no replicada de los RIs. En el caso los RIs de pBR-TerE@*AatII* se emplearon *Nb.BsmI* y *Nb.BtsI* dentro y fuera de la región replicada, respectivamente. Finalmente, en pBR-TerE@*DraI* las enzimas utilizadas fueron *Nb.BsmI* para la región replicada y *Nt.BbvCI* para la región no replicada de los RIs.

La digestión total de las formas replicativas de DNA del minicromosoma pRS316 en *S. cerevisiae* se llevó a cabo con la endonucleasa de restricción de cadena sencilla *Nt.Bpu10I* durante 1 hora a 37°C; mientras que el tratamiento parcial se realizó en las mismas condiciones pero durante 15 minutos.

3.9.3. Digestión *in situ* con la enzima de restricción *EcoRI* entre la primera y la segunda dimensión.

La digestión enzimática en gel antes de la segunda dimensión se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Martín-Parras y colaboradores (Martín-Parras et al., 1992) con algunas modificaciones.

La primera dimensión se realizó en geles a una concentración de 0.4% de agarosa SeaKem LE en TBE 1x y se corrió a 0.9 V/cm durante 25 horas a temperatura ambiente. Dos calles del gel, una con el DNA a digerir y otra con la misma muestra para ser utilizada como control, se cortaron con ayuda de un bisturí. A continuación ambas calles se lavaron

dos veces con tampón TE4 1x durante 30 minutos y se incubaron también dos veces con 100 ml del tampón de la enzima de restricción *EcoRI* (Roche), durante 2 horas a temperatura ambiente y con agitación suave. La digestión con la enzima de restricción *EcoRI* se llevó a cabo colocando la calle del gel sobre un trozo de Parafilm® (Pechiney Plastic Packaging) dentro de una cámara húmeda a 37°C. Sobre esa calle se añadieron 1.5 ml del tampón de la enzima de restricción conteniendo 200 U/ml de *EcoRI* y se incubó durante 16 horas. Sobre la calle control se añadió el mismo volumen de tampón sin la enzima. Tras la digestión, las calles se lavaron dos veces con tampón TBE 1x durante 15 minutos a temperatura ambiente y con agitación suave. A continuación se llevaron a cabo las segundas dimensiones en geles de 1% de agarosa SeaKem LE en TBE 1x que se corrieron a 5 V/cm durante 10-15 horas a 4°C.

3.10. Análisis del DNA.

3.10.1. Electroforesis en geles de agarosa.

3.10.1.1. Electroforesis unidimensional.

El análisis del DNA por electroforesis unidimensional se realizó en geles de agarosa D1 media EEO, agarosa MetaPhor (para comprobar el anillamiento de los oligonucleótidos empleados en el clonaje) o en agarosa de bajo punto de fusión (para la extracción de RIs) a distintas concentraciones dependiendo del tamaño de las moléculas de DNA a analizar y utilizando como tampón TBE 1x o TAE 1x. Como marcador de pesos moleculares se utilizó DNA del bacteriófago lambda digerido con *HindIII* (Fermentas) o bien DNA del plásmido pBR322 digerido con *MspI* (New England Biolabs). A las muestras se les añadió, previamente a su carga en el gel, 1/10 de volumen de tampón de carga bicolor.

Los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (Sigma) a una concentración de 1 µg/ml y se examinaron en un transiluminador de luz ultravioleta de 250 nm de longitud de onda.

3.10.1.2. Electroforesis bidimensional neutra-neutra.

El análisis de DNA se realizó mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa. Esta técnica, basada en que tanto el tamaño como la forma de una molécula de DNA influyen en su movilidad electroforética, se realizó siguiendo el protocolo descrito originalmente por Brewer y Fangman (Brewer and Fangman, 1987) con ligeras modificaciones de acuerdo al tamaño de las moléculas, según se tratara de formas intactas o digeridas.

3.10.1.3. Electroforesis bidimensional de formas intactas.

Las condiciones de baja concentración de agarosa y bajo voltaje de la primera dimensión permiten separar las moléculas de DNA fundamentalmente en función de su tamaño. Para analizar la replicación de plásmidos bacterianos intactos así como del minicromosoma pRS316 en *S. cerevisiae* (todos ellos de un tamaño en torno a las 4 Kb), la primera dimensión se desarrolló en geles a una concentración de 0.4% de agarosa SeaKem LE en TBE 1x y se corrió a 0.9 V/cm durante 25-30 horas a temperatura ambiente. Las condiciones de alta concentración de agarosa y alto voltaje de la segunda dimensión permiten separar las moléculas de DNA fundamentalmente en función de su forma. Ésta se desarrolló en geles de 1% de agarosa en TBE 1x y se corrió a 5 V/cm durante 10-12 horas a 4°C.

En aquellos casos en los que quisimos estudiar el tipo de Wr se utilizó cloroquina (Sigma) como agente intercalante durante la primera y/o la segunda dimensión. Las concentraciones de cloroquina utilizadas, tanto en el gel de agarosa como en el tampón TBE 1x de la cubeta de electroforesis, fueron de 0.1 a 0.5 µg/ml y de 0.1 a 20 µg/ml en la primera y segunda dimensión, respectivamente.

3.10.1.4. Electroforesis bidimensional de formas digeridas.

Para analizar la replicación de fragmentos cuyo tamaño estaba en torno a las 4 Kb, en la primera dimensión utilizamos geles a una concentración de 0.4% de agarosa SeaKem LE en TBE 1x y se corrieron a 0.9 V/cm durante 22 horas a temperatura ambiente. La segunda dimensión se realizó en geles a una concentración de 1% de agarosa en TBE 1x y se corrieron a 5 V/cm durante 8 horas a 4°C en presencia de 0.3 µg/ml de bromuro de etidio.

3.10.2. Transferencia del DNA a soportes sólidos.

Las muestras de DNA analizadas en geles de agarosa se transfirieron a membranas de nailon (ZetaProbe® *GT Blotting Membranes* de Bio-Rad) según el método de Southern (Southern, 1975) y de acuerdo al protocolo de transferencia alcalina descrito por López-Estraño y colaboradores (López-Estraño et al., 1998).

3.10.3. Marcaje e hibridación del DNA.

3.10.3.1. Marcaje de sondas de DNA no radiactivas.

Las sondas de DNA (300 ng de DNA) se marcaron con digoxigenina mediante el kit de marcaje no radiactivo *DIG-High Prime* de Roche, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

3.10.3.2. Hibridación con sondas de DNA no radiactivas.

Las membranas de nailon se incubaron en botellas cilíndricas, durante 4-6 horas a 65°C, en 20 ml de una solución de SSPE 2x (NaCl 360 mM, Na₂HPO₄·7 H₂O 20 mM, EDTA 2mM, pH 8.0), leche descremada al 0.5%, sulfato de dextrano al 10%, SDS al 1% y DNA de esperma de salmón (AppliChem) a 0.5 mg/ml sonificado y desnaturalizado.

Para la hibridación, añadimos a la solución anterior la sonda desnaturalizada a una concentración final de 25 ng/ml e incubamos en las botellas durante 16 horas a 65°C. Transcurrido ese tiempo las membranas se sometieron a tres lavados sucesivos, de 15 minutos cada uno, con SSC 2x/ SDS 0.1%, SSC 0.5x/ SDS 0.1%, SSC 0.1x/ SDS 0.1% (este último precalentado a 65°C). Finalmente, se realizó la detección con un anticuerpo conjugado (*Anti-Digoxigenin-AP* de Roche) y un sustrato quimioluminiscente (*CDP-Star®*, PerkinElmer) según el protocolo descrito por la casa comercial.

3.10.4. Densitometría.

Los análisis densitométricos de las autorradiografías se realizaron con el programa NIH ImageJ 64.

3.10.5. Secuenciación.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática de DNA (SSAD) del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) empleando el secuenciador automático ABI PRISM 3700 *DNA Analyzer* de Applied Biosystems.

3.10.6. Enriquecimiento y aislamiento de RIs de plásmidos de *E. coli* en geles de agarosa.

El enriquecimiento y aislamiento de RIs anudados, a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión, se realizó mediante la digestión de la agarosa con β -Agarasa I (New England Biolabs) como se indica a continuación.

En primer lugar, se analizaron muestras de RIs tratados con endonucleasas de restricción de cadena sencilla en la porción no replicada de los plásmidos pBR-TerE@*Aat*II y pBR-TerE@*Dra*I en sendos geles bidimensionales de agarosa para estudiar la movilidad electroforética de las moléculas de interés. Así pudimos determinar que en primera dimensión las formas anudadas de los RIs de ambos plásmidos migran entre los OCs de monómeros y los OCs de dímeros. A continuación, se analizó cada una de esas mismas muestras en un gel unidimensional de agarosa de bajo punto de fusión a una concentración del 0.4 % en TBE 1x y se corrió a 0.9 V/cm durante 36 horas a temperatura ambiente. La distribución de las muestras en el gel puede verse en la figura 9A. En el primer pocillo de los geles se cargó DNA del bacteriófago lambda digerido con *Hind*III como marcador de peso molecular y en el segundo se colocó una alícuota de DNA del plásmido correspondiente que sirvió para conocer la migración de cada una de las especies moleculares presentes en las muestras y especialmente de guía para localizar los OCs de monómeros. Además, en el tercer pocillo se cargó una muestra de DNA con formas dimericas de pBR322 que sirvió de guía para localizar los OCs de dímeros. El resto de los pocillos se unieron como si fueran uno solo pero de mayor longitud para poder cargar así un mayor volumen de la correspondiente muestra de DNA a extraer.

Una vez terminada la electroforesis se cortó cada gel en dos partes: la porción de la derecha (figura 9C), con la muestra de DNA a extraer, se mantuvo a 4°C en el tampón de electroforesis TBE 1x. La porción de la izquierda (figura 9B), conteniendo el DNA del marcador de peso molecular así como una alícuota de la digestión con la endonucleasa de restricción de cadena sencilla y, en su caso, el DNA de dímeros de pBR322 se tiñó en una solución con bromuro de etidio (a una concentración de 1 µg/ml) y se examinó en un transiluminador de luz ultravioleta de 250 nm de longitud de onda, midiéndose la movilidad electroforética en centímetros de cada una de las formas de interés. De acuerdo con esta medición, con ayuda de un bisturí se cortó en cada gel de agarosa el fragmento conteniendo las moléculas a extraer (recuadro rojo en la figura 9C).

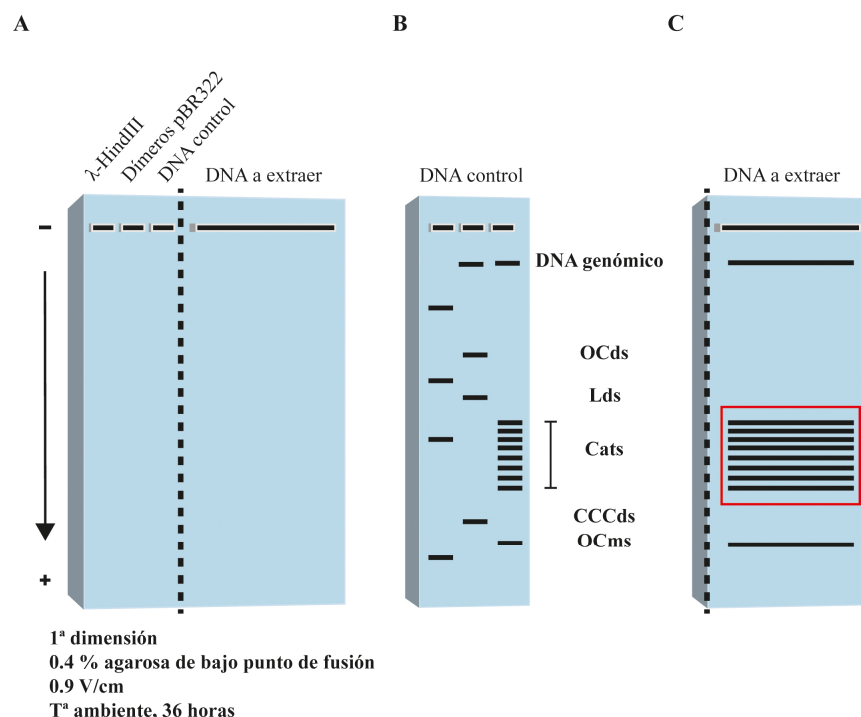


Figura 9. Diagrama esquemático del aislamiento de los RIs anudados a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión. A: Esquema del gel en el que se indican las condiciones en las que se desarrolló la electroforesis y la ubicación de las muestras. Tras la electroforesis el gel se dividió en dos partes: el gel representado en B se utilizó como control y del representado en C se aislaron los RIs anudados (enmarcados dentro de un rectángulo de color rojo) para su posterior análisis mediante AFM.

Para extraer las moléculas del fragmento de gel, se digirió la agarosa de bajo punto de fusión con la enzima β -Agarasa I siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, con ligeras modificaciones. Los fragmentos de agarosa se equilibraron, mediante dos lavados de 15 minutos en hielo, en el tampón 1x de la β -Agarasa I. Tras retirar el último tampón de lavado, los fragmentos se fundieron a 65°C. Una vez fundidos, se incubó a 42°C durante 10 minutos para equilibrar la temperatura y, a continuación, se añadió una unidad de β -Agarasa I por cada 150 μ L de agarosa fundida y se incubó durante 1 hora a 42°C. Tras esa primera hora, se volvió a añadir una unidad de β -Agarasa I por cada 150 μ L de agarosa fundida y se incubó otra hora más a 42°C. A continuación, se trataron las muestras con 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5.2, durante 15 minutos en hielo, para precipitar los carbohidratos no digeridos. Se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos y cada sobrenadante se trató con fenol varias veces (hasta que desapareció la interfase) y una última vez con CIA 24:1 (cloroformo: alcohol isoamílico). El DNA se precipitó con

2.5 volúmenes de etanol 100% frío, durante 16 horas a -20°C. Se centrifugó a 9000 rpm durante 1 hora a 4°C. Después se lavó una vez con etanol al 70% frío y se centrifugó en las mismas condiciones pero durante 15 minutos. Cada pellet se dejó secar y se resuspendió en agua destilada estéril durante, al menos, 16 horas a 4°C. Para confirmar la pureza de las muestras extraídas chequeamos alícuotas en geles unidimensionales en condiciones de segunda dimensión que se transfirieron a membranas de nailon y después se hibridaron.

3.10.7. Observación y análisis de RIs de plásmidos en *E. coli* mediante microscopía de fuerza atómica.

3.10.7.1. Preparación de las muestras para su observación al microscopio de fuerza atómica.

La microscopía de fuerza atómica es un tipo de microscopía de barrido por sondeo de muy alta resolución, del orden de fracciones de nanómetro, desarrollada en 1986 por Gerd Binnig, Calvin F. Quate y Christoph Gerber (Binnig et al., 1986). En el microscopio de fuerza atómica (AFM de sus siglas en inglés *Atomic Force Microscope*) la muestra es barrida en el plano de su superficie (X-Y) por una punta o sonda muy aguda, de un par de micras de largo y menos de 100 Å de diámetro, que se localiza al final de una micropalanca de 100 a 200 µm de largo y muy flexible. Esa micropalanca se hace vibrar a su frecuencia de resonancia mediante un actuador o escáner piezoeléctrico. Durante el barrido, la interacción punta-superficie provoca una flexión de la micropalanca que modifica la amplitud, frecuencia y fase de resonancia, mientras el actuador piezoeléctrico mantiene constante alguna de estas propiedades.

En nuestro caso empleamos el modo de operación del AFM denominado de contacto intermitente (*Tapping-Mode* AFM, TM-AFM), en el que se mantiene constante la amplitud. En este modo de operación, como su propio nombre indica, la sonda está en contacto intermitente con la superficie de la muestra a la vez que la barre. La flexión de la micropalanca es registrada mediante un haz láser que se refleja en su parte posterior para luego alcanzar un fotodetector. La señal obtenida se introduce en un circuito o lazo de

retroalimentación controlado por el escáner piezoeléctrico que determina la altura (Z) de la sonda sobre la muestra de forma que la amplitud de oscilación de la micropalanca se mantenga a un nivel constante (introducido por el operador). Así, cuando la sonda interacciona con una característica topográfica de la muestra su amplitud decrece respecto a su amplitud de oscilación previa. El AFM detecta ese descenso y la sonda se levanta de la muestra (se aleja) para volver a alcanzar la amplitud de oscilación anterior. Finalmente, un ordenador registra la trayectoria de la sonda y entonces, representando la altura de la sonda (Z) frente a su posición sobre la muestra (X,Y), es posible trazar un mapa topográfico de la muestra. Se puede desplegar la información como una imagen en escala de grises a manera de mapa de densidades. A esa imagen se le puede agregar color para mejorar el contraste y así observar mejor los cambios detectados.

Para ser estudiadas mediante AFM, las moléculas de DNA se deben depositar sobre una superficie plana, siendo la mica una de las más utilizadas. La mica recién exfoliada está cargada negativamente y, dado que el DNA también tiene carga negativa, es necesario modificar la superficie de la mica para poder depositarlo. Para ello empleamos 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES). Se trata de una molécula que se une covalentemente a la superficie de mica exponiendo su grupo amino-terminal, el cual se carga positivamente tras lavar con agua permitiendo así la adsorción de las moléculas de DNA. Debido a que la superficie de APTES-mica (AP-mica) tiene una baja densidad de carga se ha sugerido que la conformación de las moléculas de DNA apenas se ve alterada en la región inmediata a la superficie y, en consecuencia, la configuración de las moléculas adsorbidas a AP-mica es fiel a la geometría que presentan en solución (Lyubchenko and Shlyakhtenko, 1997). En definitiva, el resultado sería una imagen similar a una proyección geométrica de la conformación tridimensional de la molécula en un plano bidimensional.

Así pues, para preparar cada muestra se colocó un disco de mica de 9.9 mm de diámetro sobre la cara plana de un disco metálico de 12 mm (ambos de Ted Pella, Inc.) y se exfolió con ayuda de cinta adhesiva. Seguidamente, se trató con una solución de APTES (Sigma) al 0.025% en agua desionizada (Milli-Q® de Millopore) durante 1 minuto, se lavó con 3 ml de agua desionizada, para que los grupos amino se cargasen positivamente, y se secó con aire comprimido. Sobre esa mica modificada se depositó una alícuota del DNA

correspondiente y se incubó durante 1-2 minutos de manera que se estableciese una interacción electrostática entre el esqueleto azúcar-fosfato del DNA, de carga negativa, y la superficie de AP-mica. Tras la incubación se lavó con 1 ml de agua desionizada y se secó con aire comprimido.

Para poder determinar con más claridad la topología de las moléculas observadas decidimos recubrir el DNA con RecA. Se trata de una proteína de *E. coli* de unos 38 kDa (Sancar et al., 1980) que juega un papel muy importante en procesos como la recombinación homóloga, la inducción de la respuesta SOS y la reparación de roturas de DNA de doble cadena (Roca and Cox, 1997; Lusetti and Cox, 2002), entre otros. En presencia de ATP, o un análogo no hidrolizable, y una pequeña cantidad de un ión divalente (preferentemente Mg^{2+}) RecA forma un nucleofilamento con DNA de doble cadena (West et al., 1980). El recubrimiento del DNA con RecA mejora sustancialmente su visualización bajo el AFM y permite trazar prácticamente de modo inequívoco todo el contorno de la molécula. Por un lado, engrosa la molécula permitiendo determinar en cada cruce qué hebra pasa por encima o por debajo; además, le aporta cierta rigidez reduciendo con ello el número de cruces fortuitos (Stasiak et al., 1981; Di Capua et al., 1982; Krasnow et al., 1983). Para recubrir las muestras de DNA con RecA se siguió el protocolo descrito por Sattin y Goh (Sattin and Goh, 2004) con ligeras modificaciones. Se incubó 1 μ l de DNA con 6 μ l de ATP γ S (Sigma) a una concentración final de 1 mg/ml y 8 μ l de RecA (New England Biolabs) a una concentración final de 0.2 mg/ml, durante 1 hora a 37°C. Tras la incubación, una alícuota del DNA recubierto con RecA se depositó en AP-mica tal y como ha sido detallado en el párrafo anterior.

3.10.7.2. Observación y análisis de las muestras mediante AFM.

Las muestras de DNA, enriquecidas en las moléculas específicas y aisladas de geles de agarosa como se indica en el apartado 3.10.6., se observaron en un AFM NanoScope® IIIa (Veeco Instruments) operando en TM-AFM en aire. Se emplearon micropalancas de silicio recubiertas de aluminio (Veeco), con un radio nominal de la sonda inferior a 10 nm

y frecuencias de resonancia en el rango de 100-200 kHz. Las imágenes fueron captadas con el programa NanoScope 5.12r5 y se procesaron empleando únicamente la herramienta *Flatten*, un filtro que permite eliminar artefactos en la imagen, tales como desplazamientos horizontales o rayas, al excluir el ruido de baja frecuencia causante de los mismos. El posterior análisis y medida del contorno de las moléculas se llevó a cabo mediante los programas NIH ImageJ 64 y Ellipse versión 2.08 (*Institute of Experimental Physics, Kosice, Eslovaquia*). Con objeto de poder comparar las imágenes obtenidas, cada una con distinto zoom, todas se normalizaron respecto a una imagen, con un zoom de 1.12 μm , que tomamos como referencia.

4. RESULTADOS

Para estudiar los cambios topológicos que tienen lugar a medida que avanza la replicación en *E. coli* se construyeron tres plásmidos derivados de pBR322 en los que se clonó la secuencia terminadora de la replicación *TerE* a diferentes distancias del origen *ColE1* (tal y como se describe en Materiales y Métodos). El bloqueo del progreso de la horquilla en esos plásmidos, denominados pBR-*TerE@StyI*, pBR-*TerE@AatII*, y pBR-*TerE@DraI*, conduce a la acumulación de RIs con una masa 1.26x, 1.60x y 1.80x la masa de las moléculas no replicadas, respectivamente (ver figuras 5, 6 y 7 en Materiales y Métodos). Para analizar la topología de esos RIs se utilizó, fundamentalmente, la electroforesis bidimensional en geles de agarosa.

4.1. Análisis de los RIs intactos de pBR-*TerE@StyI*, pBR-*TerE@AatII* y pBR-*TerE@DraI* mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa.

En primer lugar, analizamos las formas intactas de los RIs de los tres plásmidos crecidos en células DH5 α F' de *E. coli* y comprobamos que, efectivamente, en cada uno de ellos la horquilla de replicación se detenía al alcanzar la secuencia *TerE*. En la figura 10, a la izquierda, se muestran las autorradiografías correspondientes y, a la derecha de cada una, su esquema interpretativo. La señal que aparece en la parte inferior derecha de todas ellas corresponde las formas superenrolladas de los monómeros no replicados, los CCCs. Éstos pueden sufrir roturas de cadena sencilla durante la extracción del DNA, también durante la primera dimensión, y en el transcurso entre la primera y la segunda dimensión, apareciendo un rastro horizontal y vertical en las autorradiografías, respectivamente. Ambos rastros hacen que los CCCs formen un ángulo recto con sus formas relajadas (OCs). En el vértice de ese ángulo recto se detecta una señal discreta muy tenue que corresponde a moléculas que sufrieron roturas de DNA de cadena sencilla entre la primera y la segunda dimensión (CCCs/OCs). Los CCCs y los OCs corresponden a moléculas que no se estaban replicando en el momento en que se detuvo el cultivo (Brewer et al., 1988; Schwartzman et al., 1990; Martin-Parras et al., 1998). En pBR-*TerE@StyI* aparece una señal muy tenue bajo la misma vertical que las OCs que corresponde a moléculas lineales (Lms), producto de roturas de doble cadena que ocurren durante la extracción del DNA. En

la autorradiografía de este mismo plásmido, se observa un segundo ángulo recto ligeramente desplazado hacia la izquierda y hacia arriba del primero, que corresponde a los CCCs y OCs parcialmente replicados con la horquilla detenida el sitio TerE de pBR-TerE@*StyI*. Para distinguirlos de los CCCs y OCs de las formas no replicativas, se denominan CCRIs (intermediarios de replicación covalentemente cerrados) y OCRIs (intermediarios de replicación relajados), respectivamente. En los otros dos plásmidos los CCRIs describen un arco. En el caso de pBR-TerE@*AatII* el arco se extiende desde la parte superior izquierda de la autorradiografía hasta la zona inferior y a la derecha de los OCs. En pBR-TerE@*DraI* el arco ocupa la zona central de la autorradiografía y se sitúa por encima de los OCs. Cada uno de los elementos de esos arcos es un topoisómero con distinto grado de ΔW_r (TopCCRIs). Tanto la movilidad electroforética como la abundancia relativa de los TopCCRIs aumenta de forma directamente proporcional a su ΔW_r . En pBR-TerE@*AatII* y pBR-TerE@*DraI* se observa una señal muy tenue en la vertical bajo la acumulación de OCRIs (AccOCRIs) que corresponde a RIs con la horquilla de replicación rota (σ RIIs).

Comparando las tres autorradiografías se observa que las señales correspondientes a las formas no replicadas (CCCs y OCs) presentan la misma movilidad electroforética ya que los tres plásmidos tienen tamaños muy similares (pBR-TerE@*StyI* 4385 bp, pBR-TerE@*AatII* 4449 bp, y pBR-TerE@*DraI* 4433 bp). En cambio, la movilidad de las moléculas parcialmente replicadas varía de acuerdo con el tamaño de la porción replicada (Olavarrieta et al., 2002b). Dicho tamaño, además de la migración, condiciona la forma de los arcos de TopCCRIs y permite distinguir si se trata de un plásmido con la horquilla detenida en *StyI*, *AatII* o *DraI*. En pBR-Ter@*StyI* el arco se localiza bajo el ángulo recto formado por CCCs y OCs, en pBR-Ter@*AatII* atraviesa ese ángulo recto a la derecha de los OCs, y en pBR-Ter@*DraI* el arco de TopCCRIs comienza por encima del ángulo recto, ocupando la mitad superior de la autorradiografía. Por otro lado, en pBR-Ter@*AatII* y pBR-Ter@*DraI* esos TopCCRIs se distribuyen entre el que exhibe mayor movilidad electroforética y otro con prácticamente la misma movilidad que los OCRIs. Es decir, un número significativo de CCRIs poseen un $W_r = 0, -1, -2, -3$, etc. En cambio, estos CCRIs con un ΔW_r cercano a cero no se detectan en el caso de pBR-Ter@*StyI*. Esta diferencia se explica porque los CCRIs se relajan a medida que avanza la replicación (Olavarrieta et al.,

2002c) y precisamente en pBR-TerE@AatII y pBR-TerE@DraI el bloqueo de la horquilla ocurre en puntos más avanzados del proceso replicativo, de ahí que en estos plásmidos un mayor número de CCRIIs muestren menor grado de ΔW_r (-).

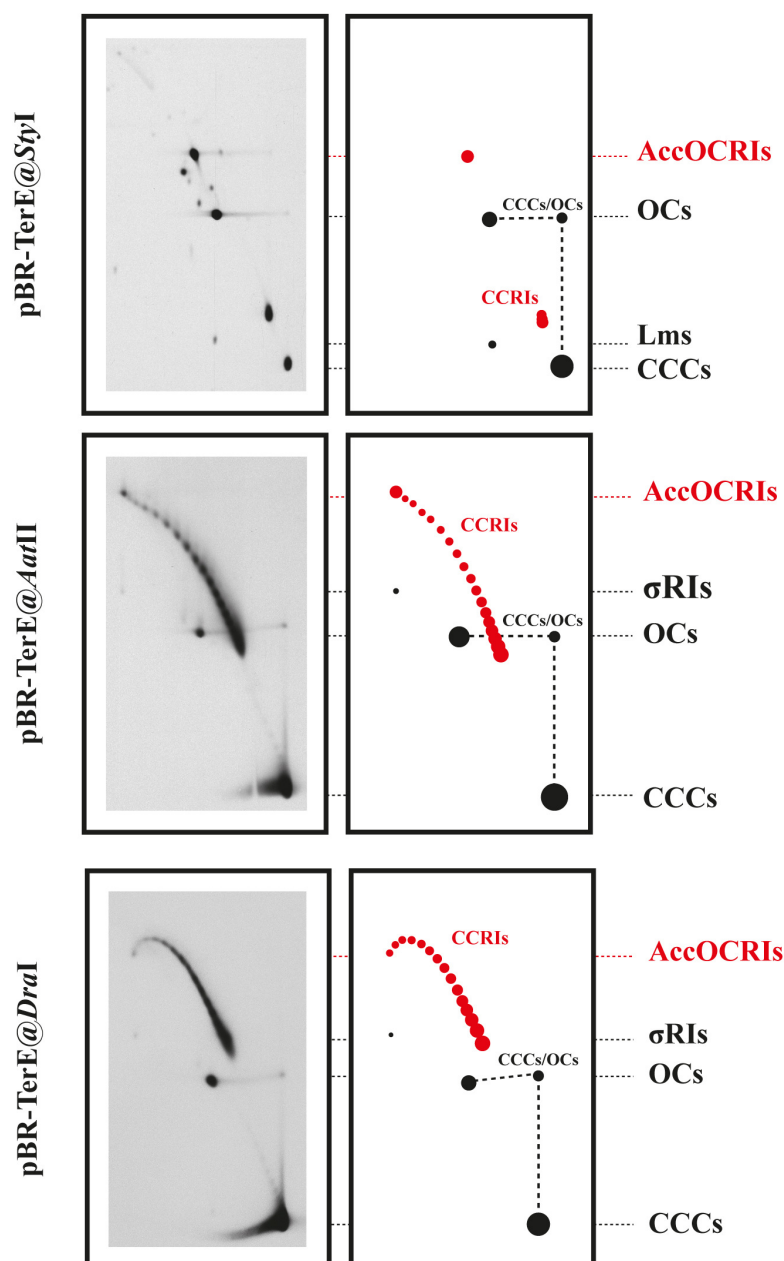


Figura 10. Análisis, mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa, de las formas intactas de los plásmidos pBR-TerE@StyI, pBR-TerE@AatII y pBR-TerE@DraI aisladas de células DH5 α F' de *E. coli*. En la columna de la izquierda se muestran las autorradiografías. A la derecha aparece el correspondiente esquema interpretativo en donde las señales de las formas no replicadas se representan mediante puntos negros y las correspondientes a las moléculas parcialmente replicadas se representa con puntos rojos.

4.2. Análisis de RIs con la horquilla detenida a distintas distancias del origen tras la introducción de roturas de cadena sencilla dentro y fuera de la región replicada en células de la estirpe DH5 α F'.

A continuación estudiamos la topología de los RIs en los tres plásmidos digeridos dentro o fuera de su región replicada mediante el tratamiento con endonucleasas de restricción de cadena sencilla.

4.2.1. Análisis de los RIs de pBR-TerE@*Sty*I mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa tras su digestión con endonucleasas de restricción de cadena sencilla.

En la figura 11A se muestra un mapa del plásmido pBR-TerE@*Sty*I sobre el que se indican los sitios de reconocimiento para las enzimas *Nt.Bpu*10I y *Nb.Bsm*I que cortan dentro y fuera de su región replicada, respectivamente. Debajo aparecen las autorradiografías que muestran el resultado de la electroforesis bidimensional tras la digestión correspondiente y el esquema interpretativo (B y C). En ambos casos la desaparición de la señal correspondiente a los CCCs indica que la digestión fue total, de manera que esas moléculas perdieron todo el Δ Wr y pasaron a migrar como OCs. El círculo de trazo discontinuo en la parte inferior derecha de las autorradiografías hace referencia a la posición que ocuparían los CCCs en una muestra intacta del plásmido. A la derecha de los OCs se extiende un arco discontinuo que corresponde a los monómeros anudados.

En la figura 11B se aprecia un segundo arco de topoisómeros que se extiende hacia abajo y a la derecha de los AccOCRIs y que corresponde a RIs anudados. Esa señal se puede detectar porque durante la manipulación del DNA o durante la electroforesis se produjeron roturas que hicieron que se eliminase el Δ Wr en los RIs anudados, apareciendo entonces los nudos antes enmascarados por el Δ Wr.

En la figura 11C se observa que al tratar la muestra con la enzima que corta en la región no replicada (*Nb.Bsm*I) esa señal de RIs anudados se intensifica. Pero, sin duda, lo más llamativo de esta autorradiografía es que la señal correspondiente al arco de CCRIs

desaparece. En los esquemas las señales correspondientes a los OCs y Lms se representan mediante puntos negros, y las correspondientes a las moléculas parcialmente replicadas se representa mediante puntos de color rojo. Los arcos de puntos verdes y azules representan las formas anudadas de los monómeros no replicados y de los RIs, respectivamente.

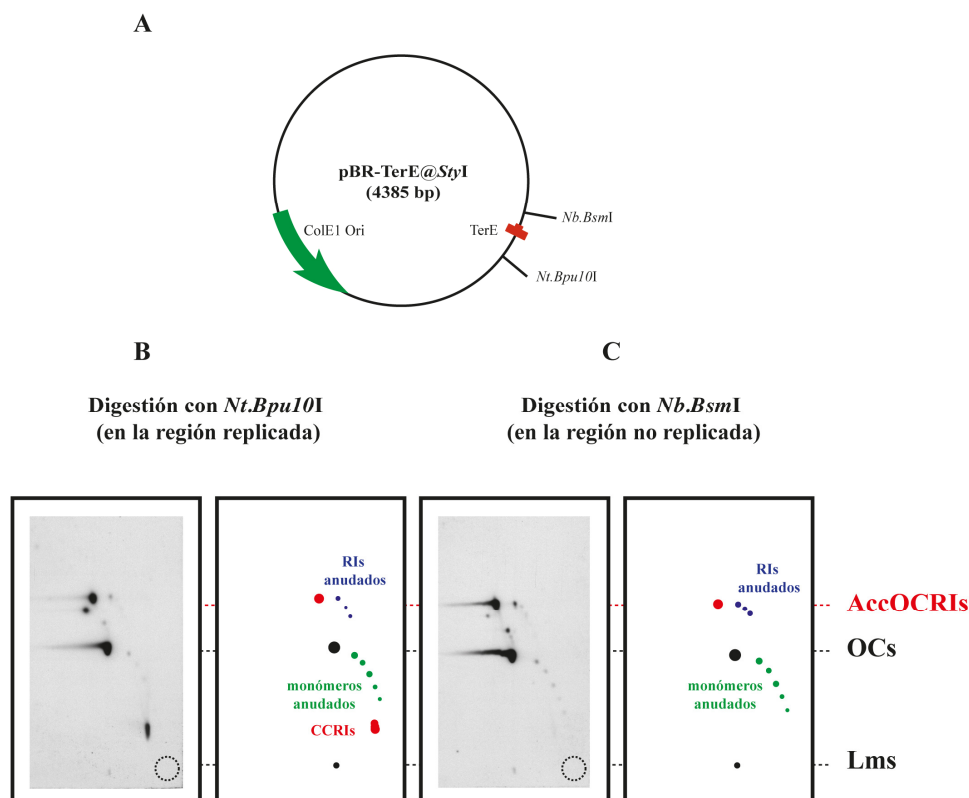


Figura 11. Análisis de los RIs de pBR-TerE@*StyI* mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa tras la introducción de roturas de cadena sencilla dentro o fuera de la región replicada. **A:** Mapa del plásmido sobre el que se indican los sitios de corte de las enzimas utilizadas. Se muestra además la posición y orientación del origen unidireccional de replicación ColE1 (flecha verde) y del terminador *TerE* (en color rojo). **B:** Autorradiografía del gel bidimensional correspondiente a la digestión con *Nt.Bpu10I*, dentro de la región replicada. A la derecha se muestra el esquema interpretativo. **C:** Autorradiografía del gel bidimensional tras la digestión en la región no replicada con *Nb.BsmI*. Respecto al anterior, se observa que el arco de CCRIs ha desaparecido y que la señal correspondiente a RIs anudados, a la derecha de los OCRIs, tiene más intensidad. En ambos casos, la desaparición de la señal de los CCCs permite comprobar que la digestión fue completa. En los esquemas, las señales correspondientes a los OCs y Lms se representan mediante puntos negros, y las correspondientes a las moléculas parcialmente replicadas mediante puntos rojos. Los arcos de puntos verdes y azules representan los monómeros anudados y los RIs anudados, respectivamente.

4.2.2. Análisis de los RIs de pBR-TerE@AatII mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa tras su digestión con endonucleasas de restricción de cadena sencilla.

En la figura 12A se señalan los sitios de reconocimiento de *Nb.BsmI* y *Nb.BtsI* sobre el mapa de pBR-TerE@AatII. En B y C se muestran las autorradiografías resultado de las digestiones junto con el correspondiente esquema interpretativo.

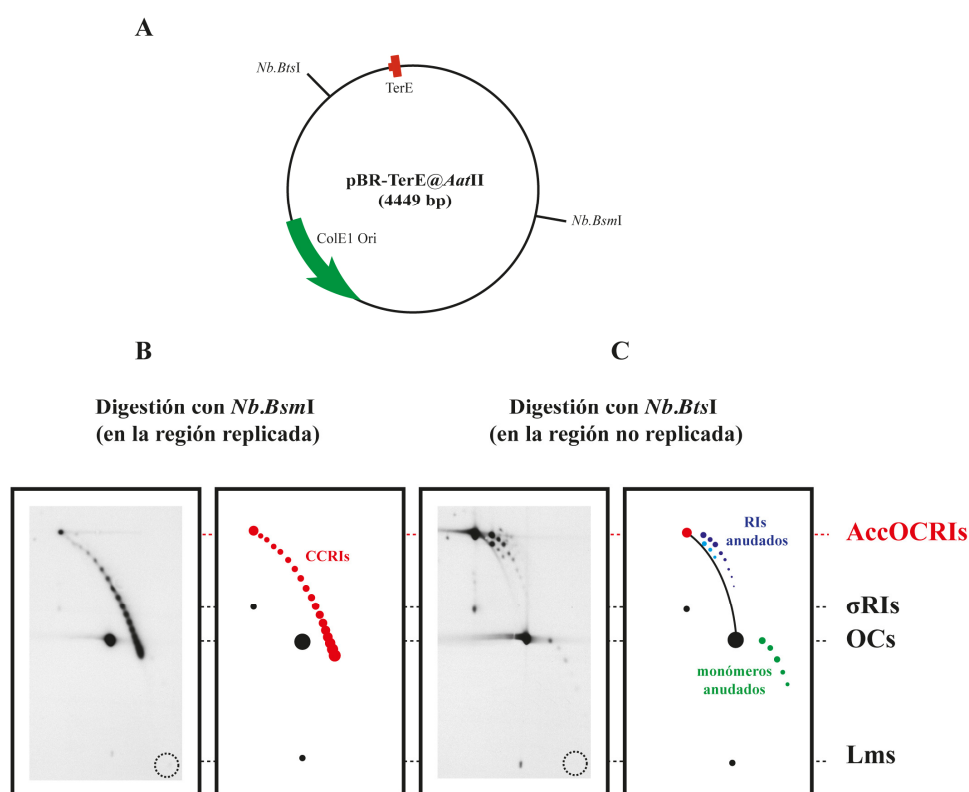


Figura 12. Análisis de pBR-TerE@AatII mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa tras su digestión dentro o fuera de la región replicada. A: Mapa del plásmido en el que se señalan los sitios de corte de las enzimas. **B:** Autorradiografía del gel bidimensional del plásmido tratado con *Nb.BsmI* en la región replicada. **C:** Autorradiografía del gel bidimensional del mismo plásmido pero tratado esta vez con *Nb.BtsI* que actúa en la región no replicada. En este caso desaparecen los CCRIs y aparecen en su lugar arcos de RIs anudados, representados por puntos en dos tonalidades de azul, que se extienden hacia abajo y a la derecha de los AccOCRIs.

De nuevo, no se aprecian CCCs indicando que la digestión, en ambos casos, fue total. Además, al igual que sucedió con pBR-TerE@*StyI*, el arco de CCRIs desaparece sólo cuando la rotura de cadena sencilla tiene lugar en la región no replicada y en su lugar aparecen dos arcos de topoisómeros que se extienden hacia abajo y a la derecha de los AccOCRIs y que corresponden a dos poblaciones RIs anudados. En esta autorradiografía (C) se aprecia además un arco continuo entre los OCs de monómeros y los AccOCRIs que corresponde a los RIs de una pequeña proporción de la población de plásmidos en los que la horquilla no se detiene al llegar a los complejos *Ter*-Tus de manera completan la replicación. En los esquemas se asigna a las diferentes señales el mismo patrón de color que en las figuras anteriores.

4.2.3. Análisis de los RIs de pBR-TerE@*DraI* mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa tras su digestión con endonucleasas de restricción de cadena sencilla.

Para introducir roturas de cadena sencilla dentro y fuera de la región replicada del plásmido pBR-TerE@*DraI* se utilizaron *Nb.BsmI* y *Nt.BbvCI*, respectivamente. Sus sitios de reconocimiento se señalan en el mapa de la figura 13A.

En las autorradiografías (B y C) se comprueba que la digestión fue total debido a la ausencia de los CCCs que pasan a migrar como OCs, haciendo que la señal de éstas últimas se incremente tanto que aparece un rastro o *trailing* hacia el lado izquierdo de las autorradiografías.

Como ya sucedió con los dos plásmidos anteriores, la diferencia fundamental entre el tratamiento con una u otra enzima radica en la desaparición del arco de CCRIs sólo cuando se emplea aquella que actúa en la región no replicada (C). En su lugar, aparecen dos arcos de topoisómeros que se extiende a la derecha y por encima de los OCRIs y que corresponden a sendas poblaciones de RIs anudados.

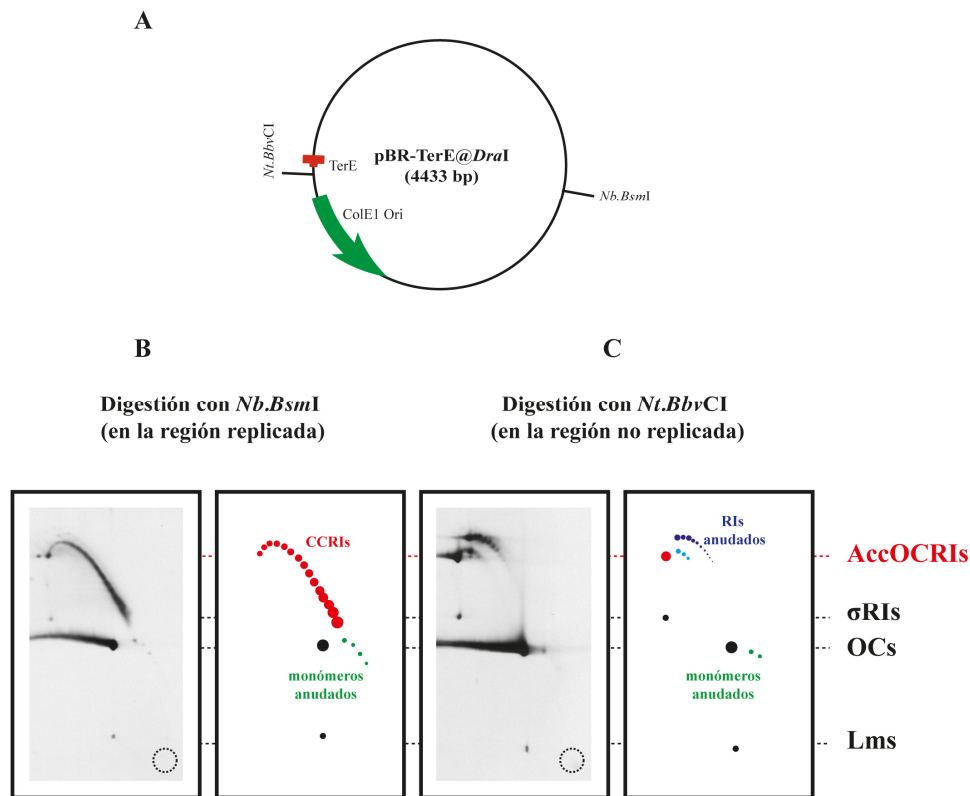


Figura 13. Análisis de pBR-TerE@DraI mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa tras la digestión dentro o fuera de la región replicada. A: Mapa del plásmido donde se señalan los sitios de corte de las enzimas utilizadas. B: Autorradiografía del gel bidimensional tras el tratamiento con *Nb.BsmI* que actúa en la región replicada. C: Autorradiografía tras el tratamiento con *Nt.BbvCI* que actúa en la región no replicada del plásmido. En este caso la señal de CCRIs ha desaparecido y aparecen en su lugar dos arcos de topoisómeros correspondientes a distintas poblaciones de RIs anudados, que se extienden a la derecha y por encima de los AccOCRI.

4.3. Análisis plasmídico y fenotípico de la exposición a la temperatura restrictiva de células con la mutación *parE*.

Tal y como se comentó en la introducción, entre otras funciones la Topo IV se encarga de desanudar así como de resolver los encadenados que se generan justo antes de que se complete la replicación del DNA (Zechiedrich and Cozzarelli, 1995; Zechiedrich et al., 1997; Deibler et al., 2001; Buck and Zechiedrich, 2004). Para estudiar el efecto de la inhibición de la Topo IV sobre ambas funciones empleamos la estirpe *parE10* que posee una mutación termosensible en el gen *parE* de esta enzima manera que a la temperatura permisiva de 30°C está activa pero a la temperatura restrictiva de 43°C la Topo IV se

inactiva. El primer paso consistió en comprobar que la mutación en *parE* era efectiva tanto a nivel fenotípico como a nivel molecular. Para ello transformamos a la temperatura permisiva células de la estirpe con la mutación y de la estirpe silvestre (W3110) con el plásmido pBR-TerE@*DraI*, por ser aquel en el que se encuentra más avanzada la replicación y por tanto con mayor proporción de anudamiento y encadenamiento (Olavarrieta et al., 2002c). Una vez alcanzaron la fase de crecimiento exponencial, los cultivos de ambas estirpes se crecieron a la temperatura restrictiva (43°C) durante una hora. A continuación, tomamos alícuotas para observar la morfología de las células al microscopio y analizamos los RIs intactos mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa.

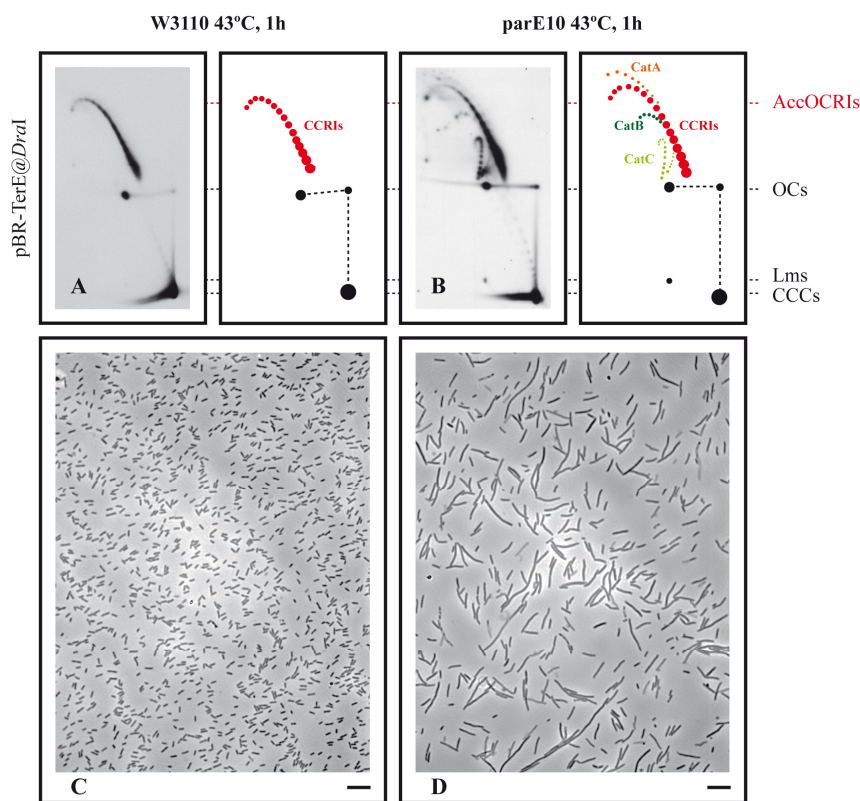


Figura 14. Análisis plasmídico y fenotípico de la exposición de células *parE10* a la temperatura restrictiva. A y B: autorradiografías correspondientes al análisis de los RIs intactos de pBR-TerE@*DraI* crecido a 43°C durante 1 hora en la estirpe silvestre W3110 o en la estirpe *parE10* con la mutación termosensible. **C y D:** micrografías de las células W3110 (Topo IV activa) y de las células *parE10* (Topo IV inactiva). Se puede apreciar el patrón anormal de división en las células mutantes *parE*, en las que tanto el nucleóide como el total de la célula presentan morfología alargada. Las barras representan 10 µm.

En la figura 14A se muestra la autorradiografía del gel bidimensional de los RIs intactos de pBR-TerE@*DraI* en la estirpe W3110, junto con su esquema interpretativo en el que se detallan las señales correspondientes a las moléculas más abundantes: CCCs, OCs, CCRIs y AccOCRIs. En la estirpe parE10 se esperaría que se acumulasen encadenados ya que la Topo IV está inhibida y es incapaz de resolverlos (Martinez-Robles et al., 2009). En efecto, en la autorradiografía mostrada en 14B se aprecian los tres tipos de encadenados Cat A, Cat B y Cat C (arcos de color naranja, verde oscuro y verde claro, respectivamente), que no aparecen en la estirpe silvestre en donde la Topo IV los resuelve al permanecer activa incluso a 43°C. En las figuras 14C y 14D se muestran las micrografías de contraste de fase de las células W3110 y parE10, respectivamente. Mientras que las células de la estirpe silvestre presentan la morfología característica de *E. coli*, las de la estirpe mutante tienen el clásico fenotipo Par (Hirota et al., 1968) en donde tanto la célula como el nucleoide presentan morfología alargada o filamentosa, acompañadas por células más pequeñas sin nucleoide debido al fallo en la segregación cromosómica consecuencia de la inactivación del gen *parE* de la Topo IV (Kato et al., 1990).

4.4. Análisis de RIs intactos con la horquilla detenida a distintas distancias del origen tras la introducción de roturas de cadena sencilla fuera de la región replicada en células parE10 crecidas a la temperatura restrictiva.

Tras confirmar que la Topo IV resulta inhibida a la temperatura restrictiva en la estirpe parE10, el siguiente paso consistió en transformar células de esa estirpe con los tres plásmidos y crecerlas durante 1 hora a 43°C. A continuación, se extrajeron los RIs y se trataron con las endonucleasas de cadena sencilla *Nb.BsmI*, *Nb.BstI* y *Nt.BbvCI* que cortan fuera de la región replicada de pBR-TerE@*StyI*, pBR-TerE@*AatII*, y pBR-TerE@*DraI*, respectivamente. En la figura 15 se muestran las tres autorradiografías y su esquema correspondiente. Como era de esperar, en los tres plásmidos se aprecia la presencia de moléculas encadenadas de tipo Cat A (arco de color naranja) junto con lo que podría ser una nueva población de encadenados o bien dímeros anudados (arco morado); cuestión que se abordará más adelante.

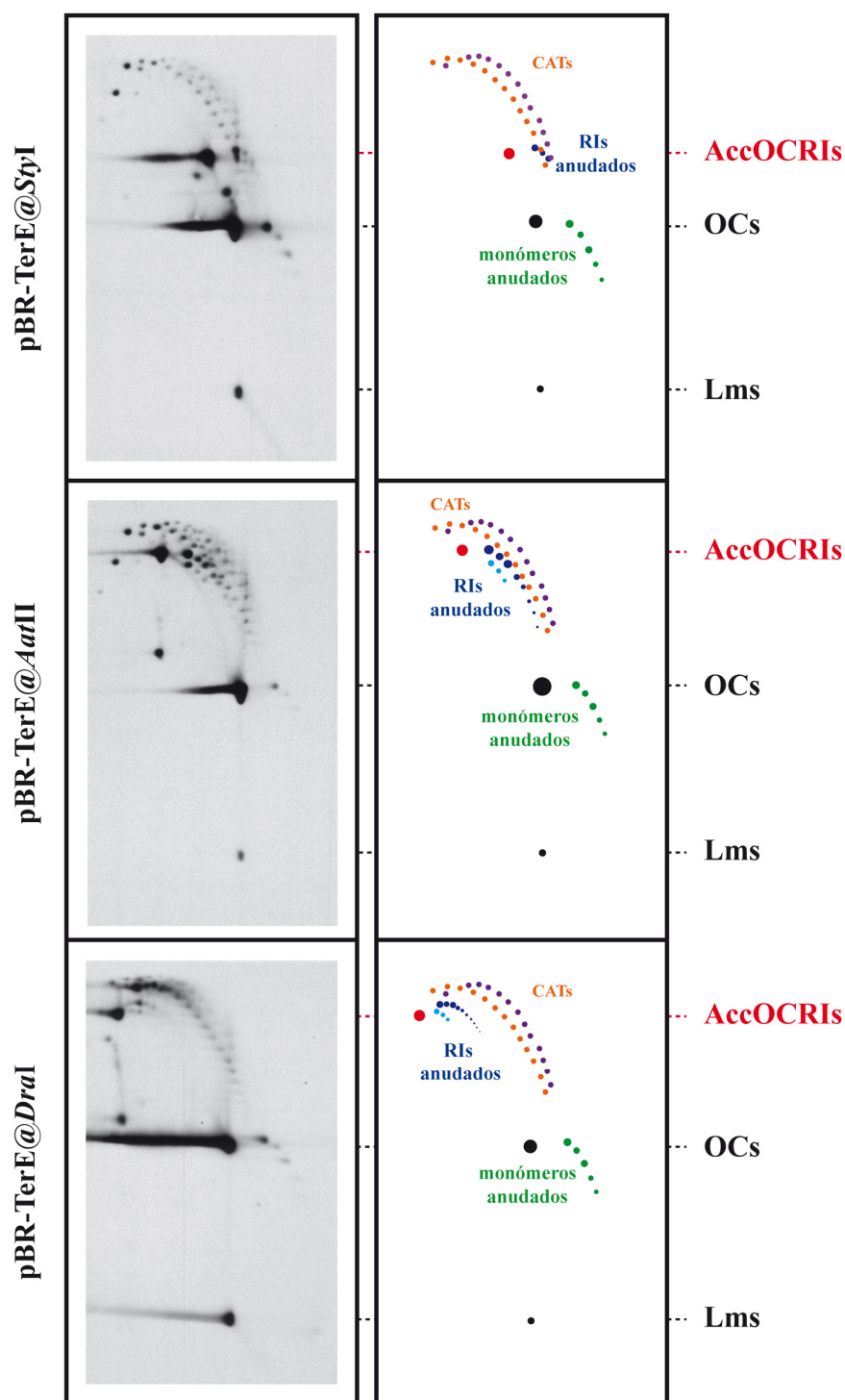


Figura 15. Análisis de los RIs de los tres plásmidos crecidos en células parE10 a la temperatura restrictiva y tratados con endonucleasas de cadena sencilla fuera de su región replicada. En los tres casos la digestión fue completa tal y como demuestra la ausencia de CCCs. En los esquemas interpretativos de la derecha se detallan las señales de las moléculas más abundantes: OCs, y Lms representados mediante puntos negros, AccOCRIs representados por un punto rojo, los arcos de monómeros anudados en color verde y los de RIs anudados en azul. En la parte superior el arco naranja corresponde a encadenados, consecuencia de la inhibición de la Topo IV.

Dado que la Topo IV se encarga de desanudar las moléculas y que aquí se encuentra inhibida, esperábamos observar un aumento de RIs anudados en comparación con los geles bidimensionales de estos mismos plásmidos crecidos en la estirpe DH5 α F'. Sin embargo, la proporción de RIs anudados en esta estirpe parE10A no difiere sustancialmente de la encontrada en la estirpe DH5 α F' en donde la Topo IV sí está activa (ver figuras 11, 12 y 13).

4.5. Análisis de los RIs del plásmido pBR-TerE@DraI en células parE10 tras la introducción de roturas de cadena sencilla en la región no replicada y expuestos a Topo IV *in vitro*.

Para demostrar que los arcos de topoisómeros en células parE10 corresponden a moléculas encadenadas o anudadas cuya aparición se debe a la inhibición de la Topo IV, tratamos una alícuota de los RIs de pBR-TerE@DraI del experimento anterior con Topo IV *in vitro*. El resultado del análisis mediante electroforesis bidimensional se muestra en la figura 16.

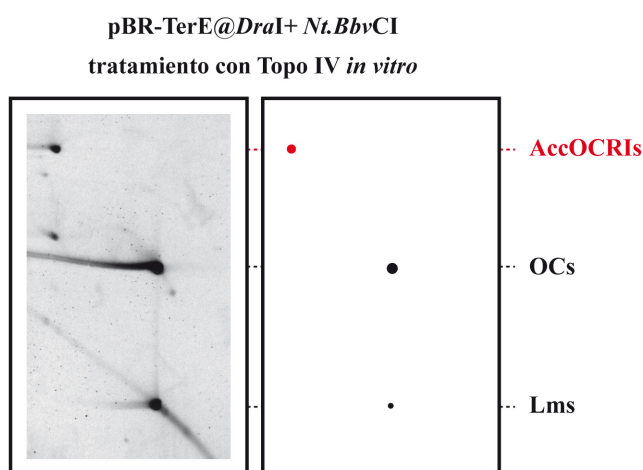


Figura 16. Análisis de los RIs de pBR-TerE@DraI, en la estirpe parE10 a la temperatura restrictiva, tratados con *Nt.Bbv*CI fuera de la región replicada y con Topo IV *in vitro*. En la autorradiografía se puede comprobar que tanto los arcos de moléculas encadenadas como los de moléculas anudadas desaparecen tras el tratamiento de la muestra con Topo IV previo a la electroforesis bidimensional.

A la vista de la anterior autorradiografía, se confirma que el tratamiento con Topo IV resolvió el encadenamiento y el anudamiento; de ahí la desaparición de los arcos de moléculas encadenadas y moléculas anudadas en comparación con la autorradiografía de la misma muestra sin tratar con Topo IV (ver figura 15, abajo).

4.6. Análisis de los RIs de los plásmidos con la horquilla detenida a distintas distancias del origen en células parE10 crecidas a las temperaturas permisiva y restrictiva tras su digestión con *A_hNI*.

Para profundizar más en el estudio del anudamiento que afecta a las cromátidas hermanas y su resolución por parte de la Topo IV, aislamos el DNA de los tres plásmidos crecidos en la estirpe parE10 a las temperaturas permisiva (30°, Topo IV activa) y restrictiva (43°C, Topo IV inactiva) durante 1 hora y lo digerimos con la enzima *A_hNI*, que los corta una sola vez fuera de la región replicada. Al tratar los RIs con una enzima de restricción que corta fuera de la región replicada (fuera de la burbuja que se acumula cuando la horquilla se detiene al llegar a *TerE*) se elimina el ΔW_r y entonces se detectan unas señales discretas a modo de cuentas de collar que corresponden a burbujas anudadas, esto es, RIs anudados (Viguera et al., 1996; Santamaría et al., 1998; Sogo et al., 1999).

En la figura 17 se muestra el resultado de la electroforesis para cada uno de los tres plásmidos crecidos a las dos temperaturas. En la parte inferior derecha de todas las autorradiografías aparece la señal de las moléculas lineales (Lms). La señal que le sigue en intensidad y que está desplazada a la izquierda se debe a RIs acumulados con una burbuja interna no anudada (Viguera et al., 1996; Santamaría et al., 1998; Santamaría et al., 2000). Las señales en forma de cuentas de collar que aparecen hacia la derecha de los RIs acumulados corresponden a las burbujas anudadas (Viguera et al., 1996; Sogo et al., 1999; Santamaría et al., 2000).

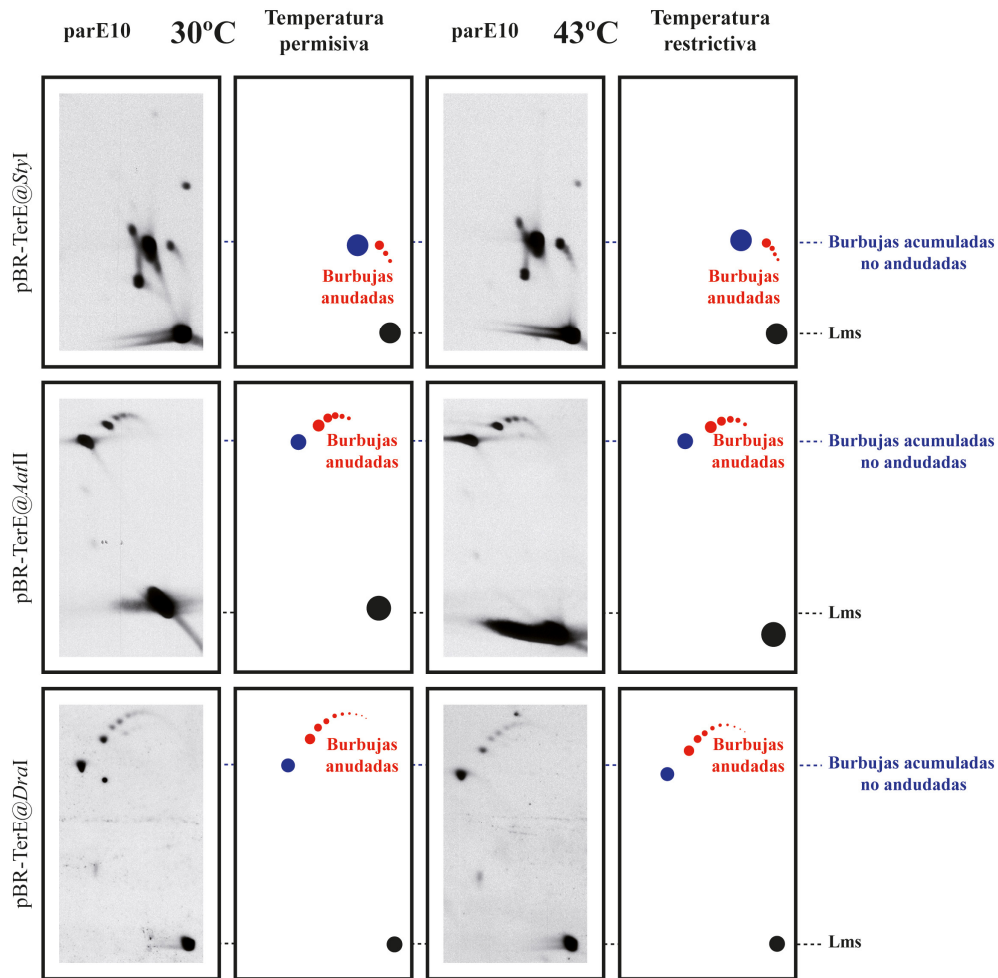


Figura 17. Análisis de los RIs de los plásmidos con la horquilla detenida a distintas distancias del origen en células parE10 crecidas a las temperaturas permisiva y restrictiva y digeridas con *AwaNI*. Las burbujas anudadas (representadas en color rojo) se detectan como señales discretas hacia la derecha de las burbujas acumuladas (en azul) cuando se elimina el ΔWt mediante digestión con la enzima de restricción *AwaNI*. En todos los casos no se aprecian diferencias significativas entre las muestras procedentes de células crecidas a la temperatura permisiva (Topo IV activa, autorradiografía a la izquierda) y aquellas extraídas de células expuestas a la temperatura restrictiva durante 1 hora (Topo IV inactiva, a la derecha).

Como se puede observar, la movilidad electroforética de las señales de burbujas anudadas difiere ligeramente para cada uno de los tres plásmidos. Esta señal se extiende a la derecha y hacia abajo de las burbujas acumuladas no anudadas en pBR-TerE@*StyI*, a la derecha y curvada por encima de las burbujas no anudadas en pBR-TerE@*AatII*, y a la derecha y aún más curvada hacia arriba en pBR-TerE@*DraI*. Esto indica que durante la primera dimensión, en la que la electroforesis transcurre en un gel de baja concentración de agarosa y a bajo voltaje, las burbujas anudadas aumentan su movilidad en función de su

complejidad, es decir, en función del número de cruces que tengan los nudos (Stasiak et al., 1996; Olavarrieta et al., 2002a). Pero durante la segunda dimensión, en la que la electroforesis transcurre en un gel de alta concentración de agarosa y a alto voltaje, su movilidad cambia dependiendo de la masa de las moléculas anudadas.

Respecto a la abundancia de burbujas anudadas, comparando la autorradiografía de cada plásmido a la temperatura permisiva con la del mismo plásmido crecido a la temperatura restrictiva se observa que la intensidad de la señal de burbujas anudadas no varía de forma significativa.

De manera que la inhibición de la Topo IV a 43°C no produce un aumento relevante de la señal de burbujas anudadas pese a ser la enzima encargada de desanudar esas burbujas.

4.7. Análisis de los RIs anudados del plásmido pBR-TerE@DraI en células parE10 expuestos a la Topo IV *in vitro* y tras su digestión con AlwNI.

Para demostrar que las señales en forma de cuentas de collar del experimento anterior se atribuyen correctamente a burbujas anudadas, tomamos una alícuota de RIs de pBR-TerE@DraI de dicho experimento digeridos con AlwNI y la tratamos además con Topo IV *in vitro* antes de proceder a realizar la electroforesis bidimensional.

El resultado se muestra en la figura 18. Se observa la desaparición del arco de burbujas anudadas tras el tratamiento con Topo IV en comparación con la autorradiografía de la misma muestra sin tratar (ver figura 17, abajo).

El perfil densitométrico que acompaña a la autorradiografía muestra que, en efecto, tras el tratamiento con Topo IV la única señal que persiste corresponde a las burbujas acumuladas no anudadas.

**pBR-TerE@*DraI* parE10 43°C, 1 hora
+ *AlwNI* + Topo IV *in vitro***

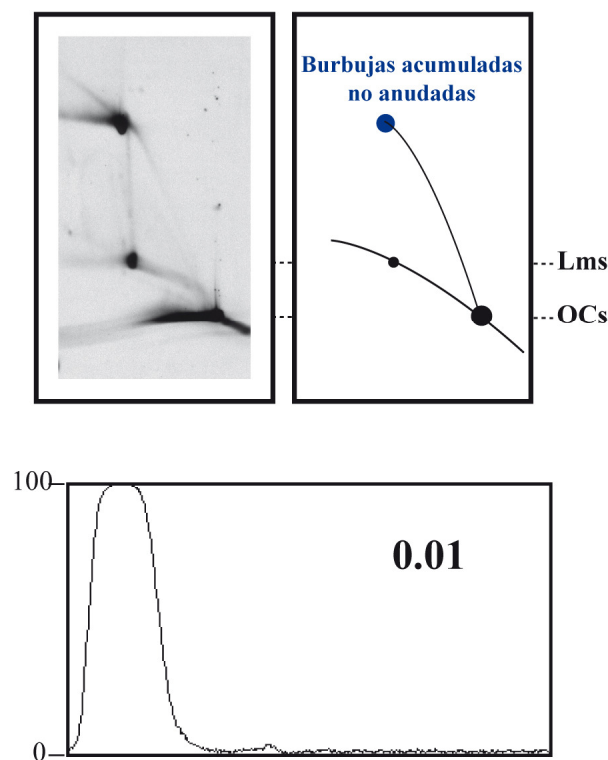


Figura 18. Análisis de los RIs anudados de pBR-TerE@*DraI* crecidos en células parE10 a 43°C y expuestos a *AlwNI* y Topo IV *in vitro*. En la autorradiografía se puede comprobar la desaparición del arco de burbujas anudadas tras el tratamiento de la muestra con Topo IV comercial. Debajo se muestra el perfil densitométrico en donde la única señal es la de las burbujas acumuladas no anudadas.

4.8. Análisis de los RIs anudados del plásmido pBR-TerE@*DraI* en células parE10 crecidas distintos tiempos a la temperatura restrictiva y tras su digestión con *AlwNI*.

El hecho de no hallar diferencias significativas entre los geles bidimensionales de las muestras de DNA de células parE10 crecidas a la temperatura permisiva o restrictiva (ver figura 17) nos llevó a estudiar más en detalle la inhibición de la Topo IV por temperatura. Para ello transformamos a 30°C células silvestres W3110 y de la estirpe parE10 con pBR-TerE@*DraI*. Una vez alcanzada la fase logarítmica, se pasó el cultivo de la estirpe W3110 a 43°C y se tomó una muestra (tiempo cero). Las células parE10 se pasaron también a esta temperatura y se tomaron muestras a los 60 y a los 120 minutos.

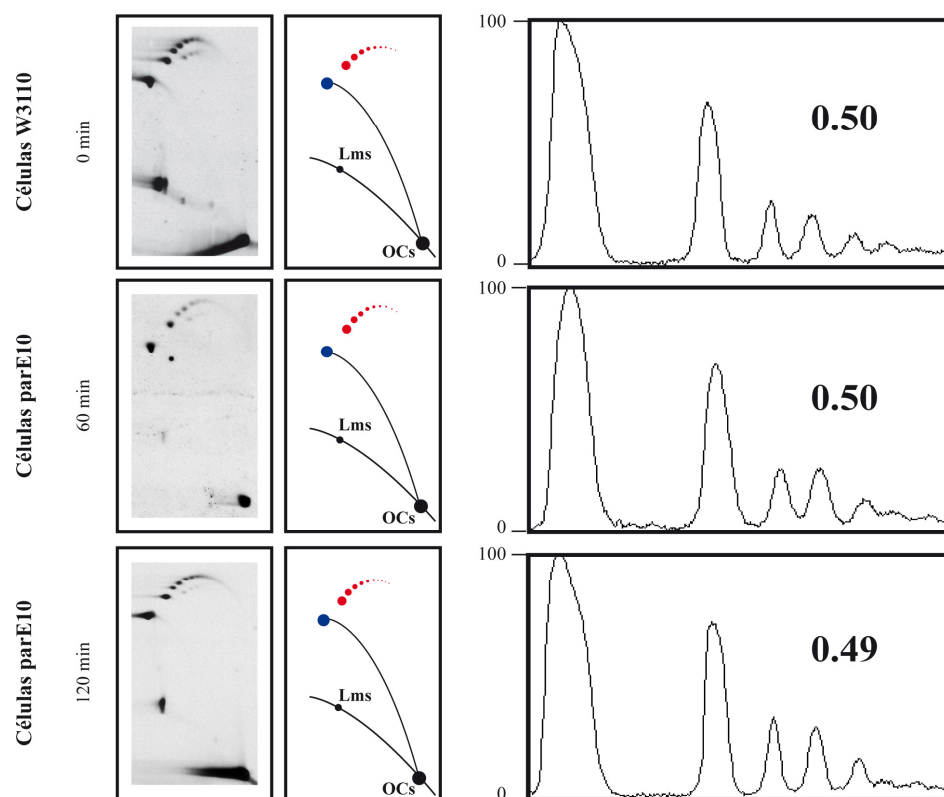
pBR-TerE@*Dra*I 43°C + *Alw*NI

Figura 19. Análisis de los RIs anudados de pBR-TerE@*Dra*I crecido distintos tiempos a la temperatura restrictiva. A la izquierda se muestra el resultado de las electroforesis bidimensionales de pBR-TerE@*Dra*I crecido en la estirpe silvestre a 43°C y en parE10 a esa misma temperatura durante una o dos horas. Cada autorradiografía fue escaneada y la región donde migraron las señales de las burbujas no anudadas (en azul) y anudadas (en color rojo) fue analizada por densitometría para determinar la proporción de estas últimas. Los perfiles densitométricos resultantes se muestran a la derecha y sobre ellos la proporción de burbujas anudadas.

Finalmente, se aisló el DNA de cada muestra, se trató con *Alw*NI y se analizó mediante electroforesis bidimensional. En la figura 19 se muestran las autorradiografías y los perfiles densitométricos de la zona donde migraron las señales correspondientes a las burbujas anudadas y no anudadas.

El área total de las señales se midió usando el programa NIH Image J64. En cada caso, calculamos la proporción de burbujas anudadas comparando su área con el área total. A la vista de los resultados, dicha proporción permaneció prácticamente constante para los distintos tiempos de inhibición de la Topo IV: 0.50 a tiempo cero, 0.50 a los 60 minutos, y 0.49 tras 120 minutos a 43°C.

4.9. Análisis de los RIs anudados del plásmido pBR-TerE@DraI en células DS9038 y DS9039 tras su digestión con *AlwNI*.

Se ha descrito la formación de RIs anudados como intermediarios durante la recombinación entre cromátidas hermanas mediada por el sistema XerCD. Este sistema emplea las dos tirosina recombinasas, XerC y XerD que le dan nombre y está implicado en asegurar que los plásmidos circulares y los cromosomas sean monoméricos antes de la segregación en la división celular, es decir, resuelve dímeros (Colloms et al., 1997; Cornet et al., 1997). Se ha propuesto que, además de convertir dímeros en monómeros, podría también desencadenar monómeros encadenados *in vivo* en una reacción en la que hay una interconversión del monómero encadenado en un dímero anudado, y en cada uno de los siguientes pasos se va simplificando la topología para finalmente dar lugar a dos monómeros libres (Ip et al., 2003; Grainge et al., 2007).

Para comprobar si el sistema de recombinación XerCD era o no responsable de los RIs anudados, transformamos las estirpes DS9038 y DS9039 defectivas en los genes *xerC* y *xerD*, respectivamente, con el plásmido pBR-TerE@DraI. Las correspondientes muestras DNA se trataron con *AlwNI* y se sometieron a electroforesis bidimensional.

Si el sistema XerCD fuese el responsable de los RIs anudados, se esperaría que éstos desaparecieran al crecer el plásmido en las estirpes con los genes *xerC* o *xerD* delecionados.

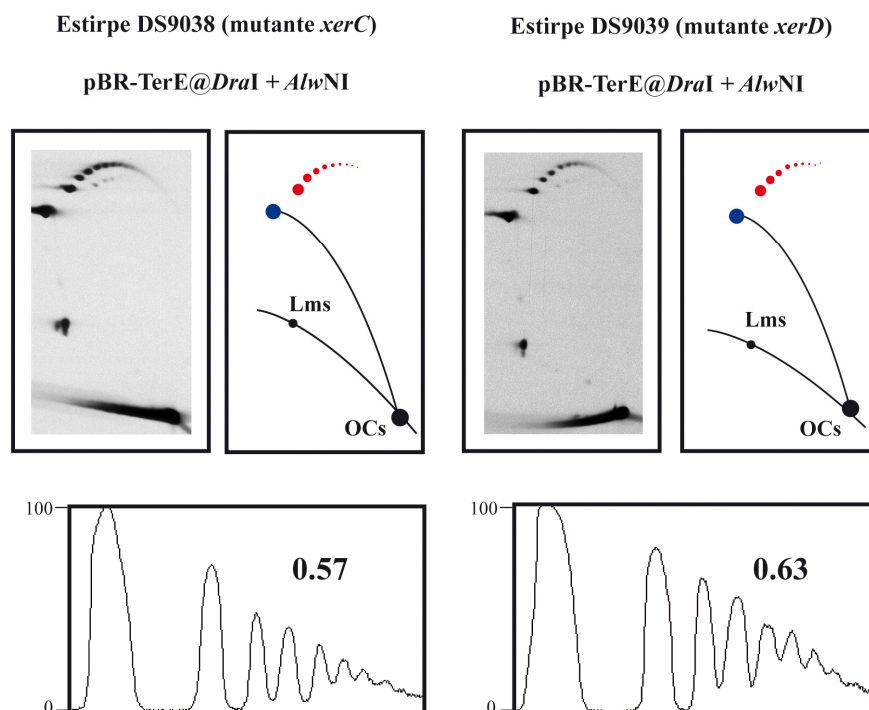


Figura 20. Análisis de los RIs anudados de pBR-TerE@*DraI* en células mutantes *xerC* y *xerD* tras su digestión con *AlwNI*. En los esquemas interpretativos las señales de las burbujas no anudadas se representan en color azul y las de las burbujas anudadas en color rojo. Debajo de cada autorradiografía se muestra el perfil densitométrico correspondiente a la zona donde migraron las burbujas anudadas y no anudadas, junto con la proporción de anudamiento.

En la figura 20 se muestran las autorradiografías en donde se observa que la señal correspondiente a los RIs anudados (burbujas anudadas) sigue estando presente. Debajo se muestran los análisis densitométricos que confirman que el nivel de RIs anudados en las estirpes DS9038 y DS9039 no difiere significativamente del encontrado en el resto de estirpes analizadas hasta ahora. Esto nos permite concluir que las proteínas XerC y XerD no están implicadas en el anudamiento de las cromátidas hermanas.

4.10. Análisis de RIs con la horquilla detenida a distintas distancias del origen mediante AFM.

Para confirmar mediante AFM la naturaleza de las moléculas identificadas como RIs anudados obtuvimos muestras enriquecidas en esas moléculas a partir de geles unidimensionales de pBR-TerE@*AatII* y pBR-TerE@*DraI* en agarosa de bajo punto de

fusión, tal y como se describe en el apartado 3.10.6. de Materiales y Métodos. La obtención de muestras enriquecidas en RIs anudados de pBR-TerE@*StyI* quedó descartada ante la escasez de tales moléculas en ese plásmido dado el pequeño tamaño de su región replicada. Mediante una electroforesis en condiciones de segunda dimensión, analizamos varias alícuotas de las muestras obtenidas para comprobar la eficacia de la técnica de enriquecimiento. El resultado obtenido, tras transferir a una membrana e hibridar, se presenta en la figura 21.

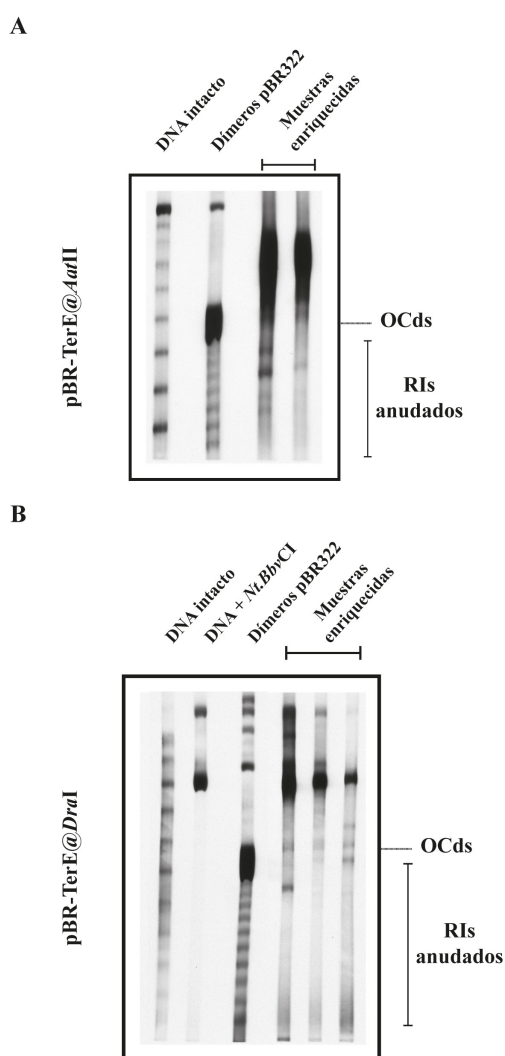


Figura 21. Validación, mediante Southern blot, del enriquecimiento en RIs anudados de las muestras pBR-TerE@*AatII* y pBR-TerE@*DraI*. En A se muestra la autorradiografía correspondiente a pBR-TerE@*AatII* y en B la del plásmido pBR-TerE@*DraI*. Sobre cada una de ellas se indica la identidad de la muestra a la que pertenece cada patrón de bandas, y a la derecha se señalan las OCds que permiten localizar los RIs anudados.

En el caso de pBR-TerE@*Aat*II (figura 21A) la primera calle corresponde a una muestra de DNA intacto. En la segunda calle se colocó una muestra de formas diméricas de pBR322 que sirvió de guía para localizar las OCs de dímeros (OCsd), por debajo de las cuales migran las formas anudadas. En las otras dos calles se cargaron las alícuotas del DNA obtenido tras enriquecer la muestra y en ellas se pueden observar un rastro o *trailing* junto con bandas discretas que corresponden a los RIs anudados. En el caso de pBR-TerE@*Dra*I (figura 21B) en la primera calle se colocó DNA intacto, en la segunda una alícuota de ese mismo DNA tratado con *Nt.Bbv*CI, y en la tercera calle la muestra de dímeros de pBR322. Esta última permite localizar las formas anudadas en las tres últimas calles en donde se cargaron alícuotas de las muestras enriquecidas. En esas alícuotas se observa la presencia de un rastro o *trailing* acompañado de bandas discretas. Estas últimas corresponden a RIs anudados y no se detectan en la muestra idéntica pero sin enriquecer, cargada en la segunda calle del gel. En resumen, para ambos plásmidos se confirmó que efectivamente las muestras estaban enriquecidas en las moléculas de interés.

4.10.1. Comparación de la visualización de moléculas de DNA desnudas y recubiertas con RecA.

El siguiente paso consistió en depositar las muestras de DNA enriquecidas sobre una superficie plana para su observación mediante TM-AFM en aire, tal y como se detalla en el apartado 3.10.7.1. de Materiales y Métodos.

En la figura 22 se muestra una de las imágenes obtenidas. En ella se puede apreciar la complejidad de las formas que adoptan las fibras de DNA desnudo además de su pequeño diámetro y su escasa altura sobre la superficie de AP-mica (2-4 nm). Todo lo anterior dificulta en gran medida un estudio topológico detallado y por ello decidimos recubrir el DNA con la proteína RecA. Esta estrategia permite determinar con más claridad la topología de las moléculas observadas ya que la unión de RecA al DNA elonga la molécula en aproximadamente un 50% (Di Capua et al., 1982), es decir, aumenta en torno a 1.5 veces la longitud del contorno del plásmido. Además, la altura del complejo DNA-RecA aumenta de manera sustancial respecto a la del DNA desnudo (de 2-4 nm a 12-15

nm, ver barras del dato de altura en la figura 23), y es posible identificar qué parte de la molécula pasa por encima o por debajo en cada uno de los cruces.

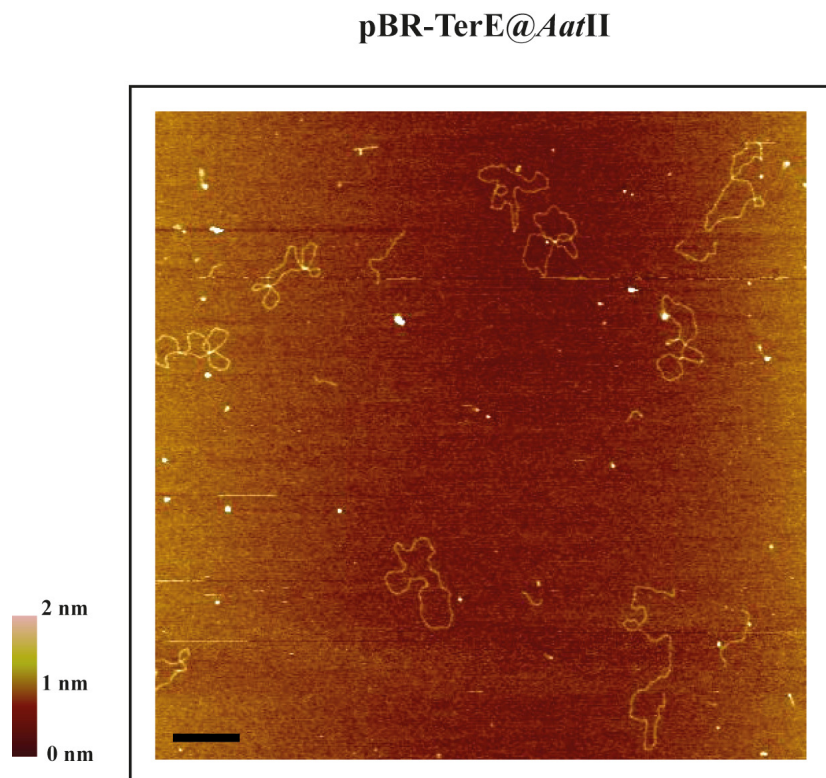


Figura 22. Visualización de moléculas de DNA mediante TM-AFM. Micrografía de moléculas de DNA desnudas correspondientes a una muestra de pBR-TerE@*AatII*. La escala para el dato de altura se muestra a la izquierda de la imagen. La barra representa 250 nm.

En la figura 23A y 23B se muestran ejemplos de moléculas sin recubrir con RecA (a la izquierda) frente a otras que sí fueron recubiertas con RecA (a la derecha). En la figura 24 aparece un RI de pBR-TerE@*AatII* y otro de pBR-TerE@*DraI* en los que una pequeña región (señalada mediante una flecha roja) quedó sin recubrir con RecA. Al comparar esa región de DNA desnudo con el resto de la molécula se puede apreciar la clara mejora de las imágenes al recubrir con RecA.

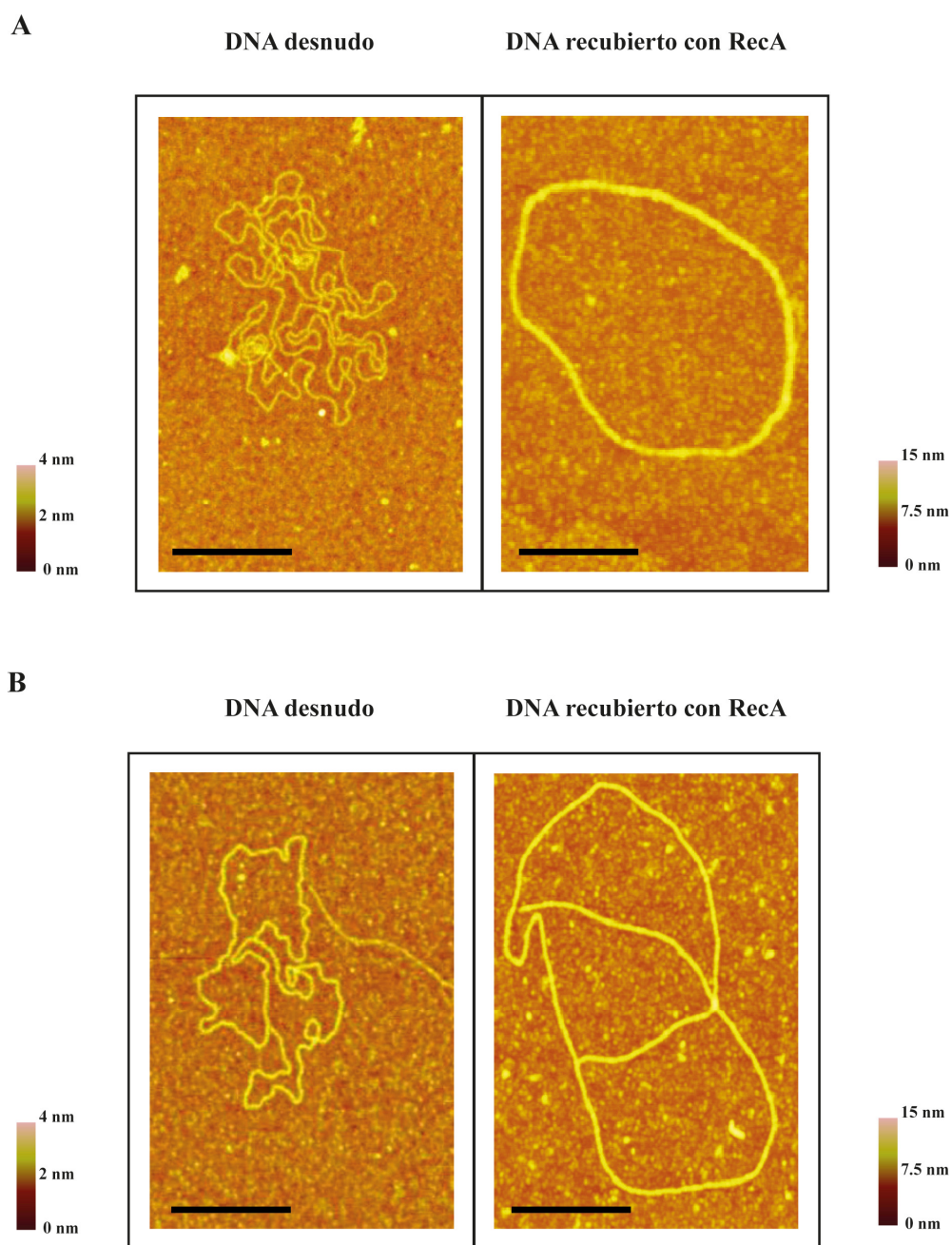


Figura 23. Comparación de la visualización mediante TM-AFM de moléculas de DNA desnudas y recubiertas con RecA. En A y B se comparan moléculas de DNA desnudas (a la izquierda) frente a otras que fueron recubiertas con RecA (a su derecha). Las barras representan 250 nm. Las escalas para el dato de altura se indican al lado de la figura correspondiente.

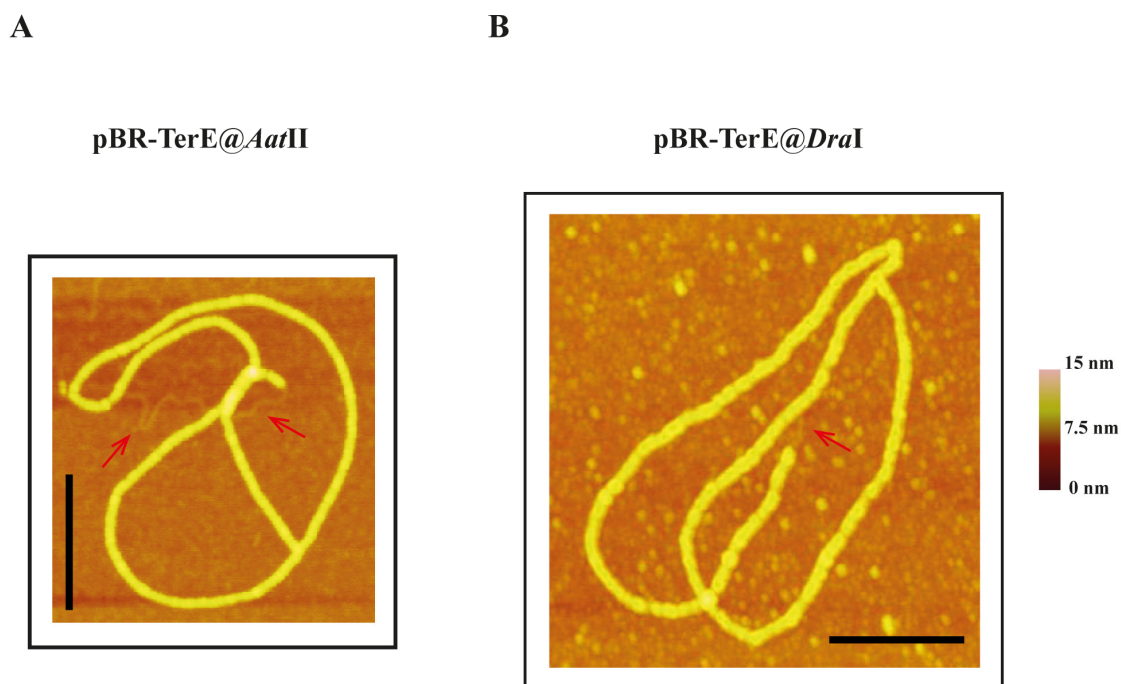


Figura 24. Ejemplos de RIs de pBR-TerE@*AatII* (A) y pBR-TerE@*DraI* (B) parcialmente recubiertos con RecA. Las flechas rojas indican la porción de DNA desnudo en ambas moléculas. Las barras representan 250 nm. A la derecha se muestra la escala para el dato de altura.

4.10.2. Comparación de la visualización en dato de altura y dato de fase.

Los dos parámetros más comúnmente utilizados para la visualización de imágenes en TM-AFM son la altura y la fase. El dato de altura (*Height data*) o topografía es a menudo el dato más útil y fiable que se puede obtener del AFM. Es la obtención estándar de imágenes topográficas y emplea unidades de distancia (μm o nm). El dato de fase (*Phase data*) se obtiene de la diferencia entre la amplitud de oscilación que tiene de partida la micropalanca y la que provoca su contacto con la superficie de la muestra. Es un parámetro útil ya que distintos materiales provocan diferentes cambios en la amplitud de oscilación de la micropalanca debido a que ésta depende de diferencias en adhesión, fricción y viscoelasticidad. Este parámetro permite obtener imágenes (llamadas comúnmente imágenes de contraste de fase) con mucha sensibilidad, detectando por ejemplo finas o sutiles crestas en la muestra.

En la figura 25 se muestra un ejemplo de los dos tipos de imágenes obtenidas para una misma muestra recubierta con RecA, un RI de pBR-TerE@*DraI* que presenta tres cruces.

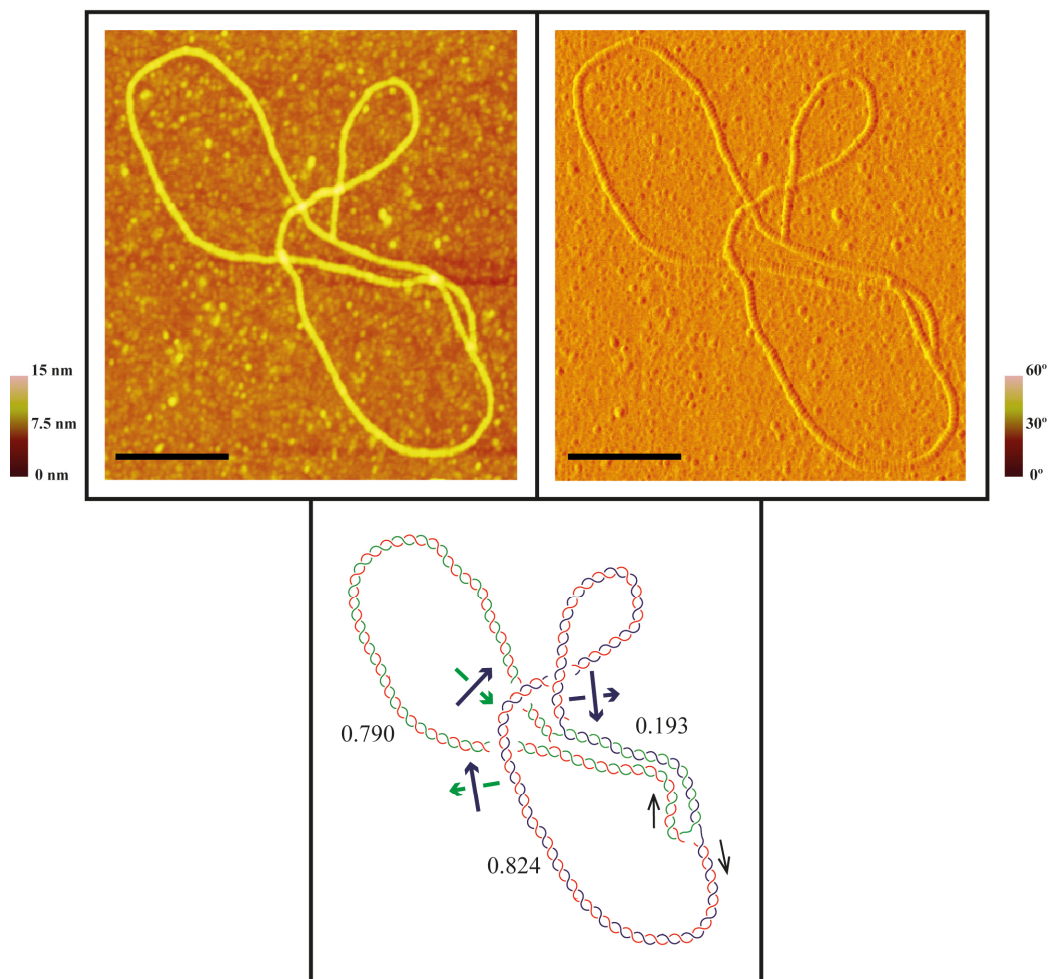


Figura 25. La obtención de imágenes mediante el parámetro fase proporciona información a escala nanométrica acerca de la estructura de la superficie de la muestra. A la izquierda se muestra la imagen de un RI de pBR-TerE@*DraI* obtenida con el parámetro altura y a la derecha una imagen de la misma molécula obtenida con el parámetro fase. Debajo se muestra el esquema interpretativo. Los dúplex parentales se dibujan en verde y azul, mientras que en los dúplex hijos las hebras nacientes se dibujan en rojo. Los números se refieren a la longitud relativa de cada brazo. Las flechas negras indican la direccionalidad de los dúplex hijos. Las flechas de color verde y azul representan los cruces. En este caso una cromátida cruza una vez sobre sí misma y dos veces sobre su cromátida hermana. La barra representa 250 nm. Las escalas para los datos de altura y fase se indica al lado de la figura correspondiente.

Bajo las imágenes se muestra un esquema interpretativo en donde los dúplex parentales se dibujan en verde y azul, y las hebras nacientes de los dúplex hijos se dibujan en rojo. Tras medir la región no replicada y las cromátidas hermanas se calculó la longitud relativa de cada brazo respecto a la longitud total de la molécula. Las flechas negras indican la direccionalidad de los dúplex hijos. Las flechas de color verde y azul representan los cruces. Gracias a la imagen de contraste de fase es posible determinar que dos de esos cruces son de una de las cromátidas sobre su cromátida hermana y el tercero sobre sí misma. Cabe destacar que en esa imagen también se pueden apreciar las estriaciones características del complejo DNA-RecA que tienen una periodicidad de unos 10 nm (Di Capua et al., 1982).

4.10.3. Visualización de RIs del plásmido pBR-TerE@AatII.

En la figura 26 se muestran micrografías de RIs del plásmido pBR-TerE@AatII recubiertos con RecA. Para la representación de los RIs en los esquemas de la derecha se sigue el mismo patrón de colores y símbolos empleado en el RI de la figura 25. En A se muestra un RI sin cruces en el que la región no replicada del plásmido representa un 0.387 de la molécula, mientras que un 0.621 y 0.606 corresponde a cada cromátida hermana. Esto es debido a que en estos plásmidos las horquillas de replicación se detienen al llegar a la secuencia *TerE*, es decir, cuando han recorrido aproximadamente un 60% de la molécula. Las demás imágenes corresponden a RIs con cruces de la porción no replicada sobre las cromátidas (B y E), o de una cromátida sobre su hermana (C y D).

En la figura 27 se muestran tres RIs anudados. El que aparece en A es un RI con un nudo tres cruces de una de las cromátidas consigo misma (nudo intra-cromátida). En el diagrama de su derecha se indica la mano (flechas azules y verdes) y el signo de los mismos. En B y C se muestran otras imágenes de RIs con nudos de tres cruces pero en este caso entre las cromátidas hermanas, esto es, nudos inter-cromátidas.

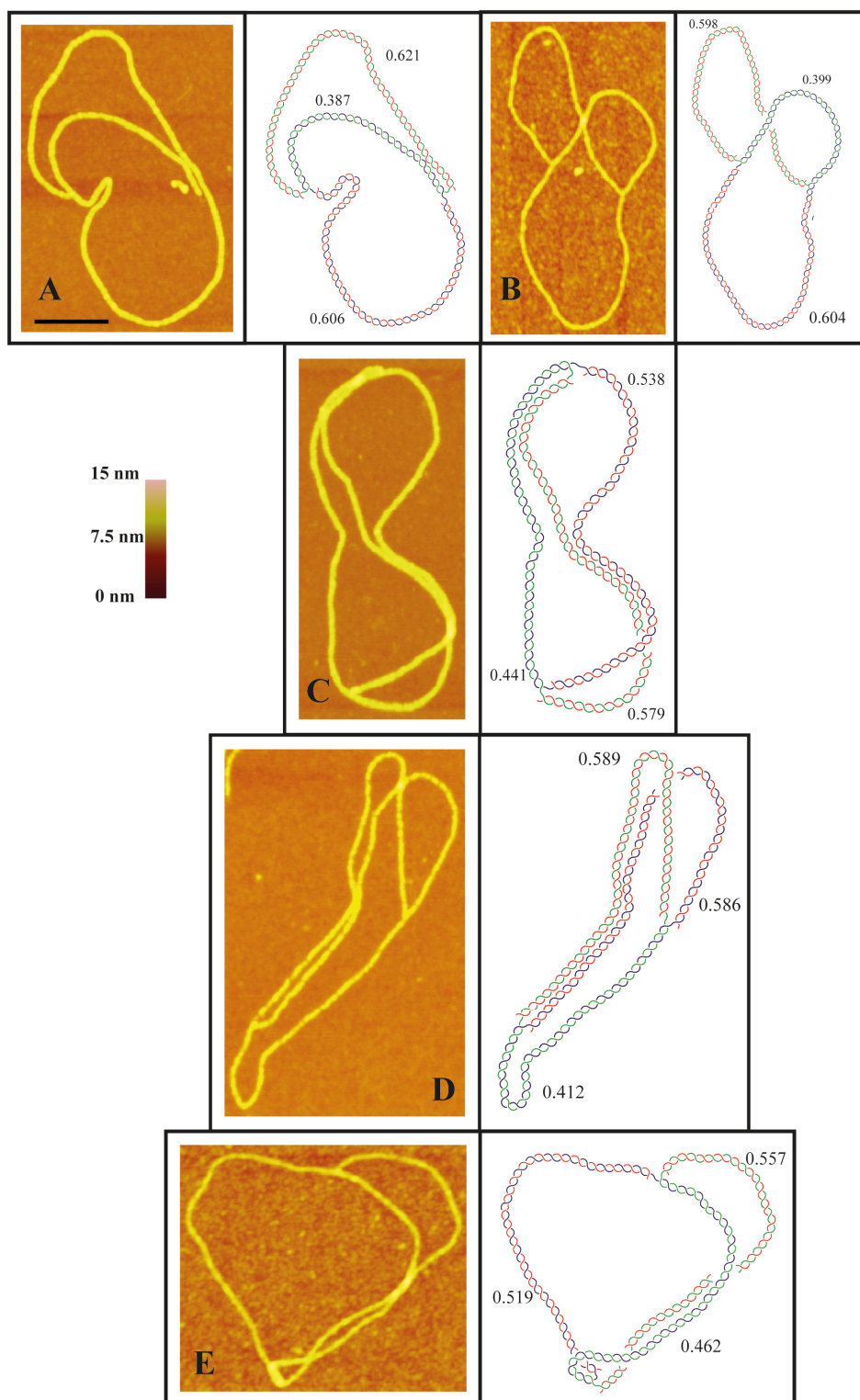


Figura 26. Visualización de RIs de pBR-TerE@AatII mediante TM-AFM. A la derecha de cada imagen se muestra un diagrama interpretativo. En A se muestra un RI sin cruces que tiene una pequeña región sin recubrir en la horquilla derecha. En el RI mostrado en B la región no replicada cruza sobre una cromátida y en el mostrado en E sobre las dos. En C y D se muestran RIs con cruces entre cromátidas hermanas. La barra representa 250 nm. La escala de altura fue de 15nm.

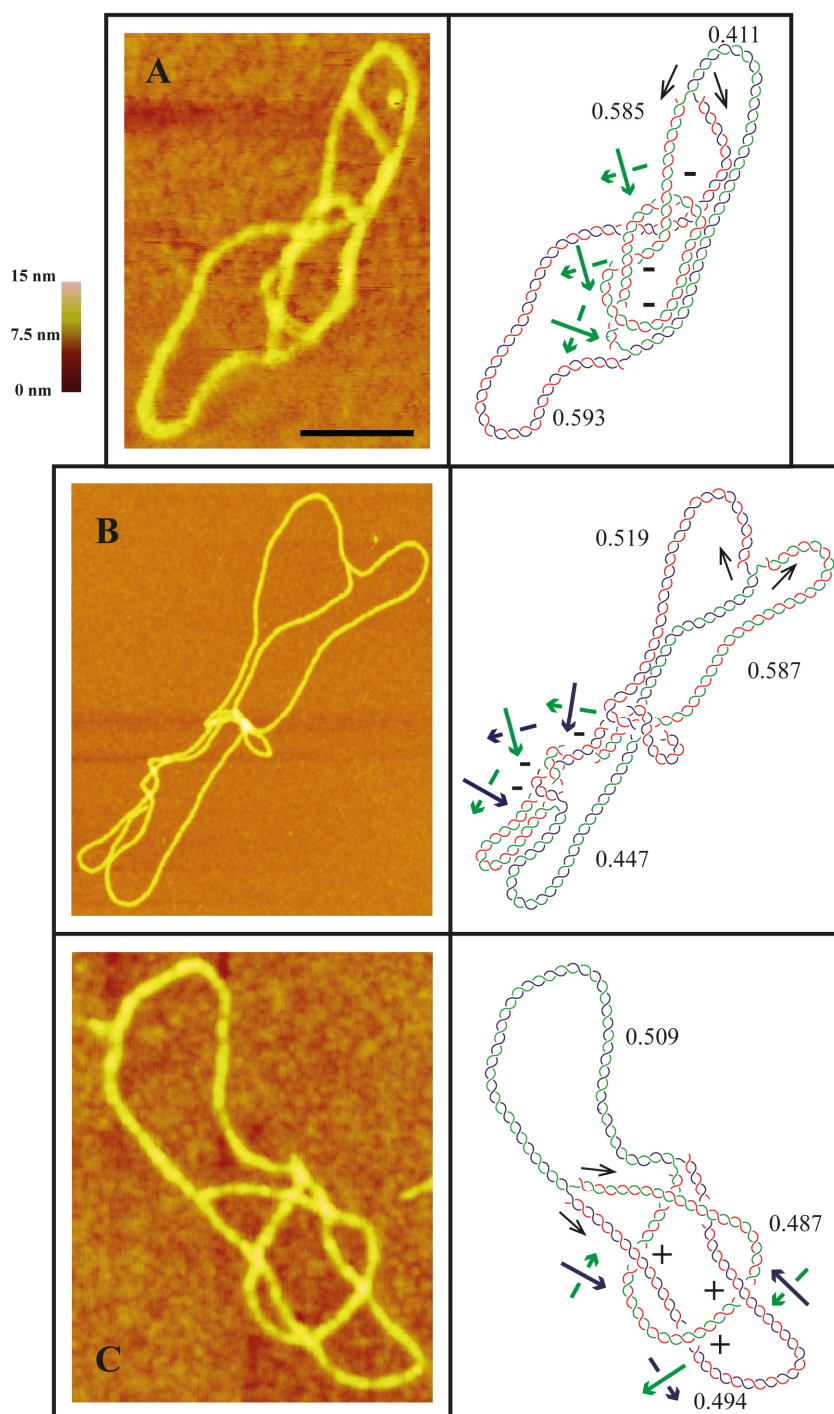


Figura 27. Visualización de RIs anudados de pBR-TerE@AatII mediante TM-AFM. Las flechas verdes y azules señalan la mano de cada cruce y los signos indican si es negativo o positivo. En A, se muestra un RI que tiene un nudo de tres cruces (los tres de signo negativo) en una de sus cromátidas. Debajo se muestran dos RIs en donde existe un nudo de tres cruces entre las dos cromátidas hermanas (nudo inter-cromátidas). En un caso los tres cruces del nudo son de signo negativo (B), mientras que en el otro son signo positivo (C). La barra representa 250 nm. La escala de altura fue de 15nm.

4.10.4. Visualización de RIs del plásmido pBR-TerE@*DraI*.

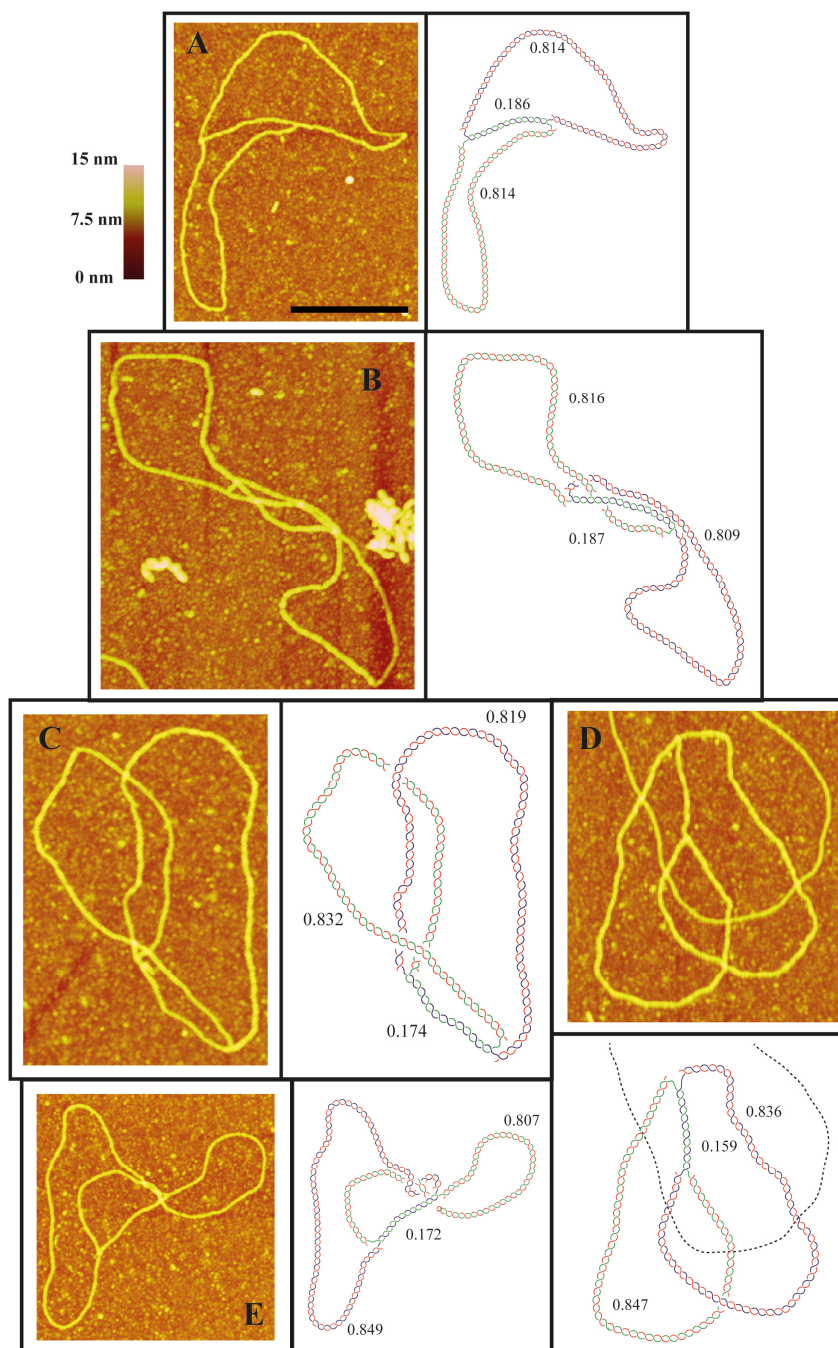


Figura 28. Visualización de RIs de pBR-TerE@*DraI* mediante TM-AFM. En el diagrama interpretativo se sigue el esquema de color y símbolos de figuras anteriores. En A se muestra un RI sin cruces. Debajo, en B, C, D y E, se muestran RIs con cruces. En D una molécula lineal, representada con un trazo punteado, reposa sobre el RI. La barra representa 250 nm. La escala de altura fue de 15nm.

En la figura 28 se muestran imágenes de RIs de pBR-Ter@*DraI* recubiertos con RecA. En A se muestra un RI sin cruces, y a la derecha su esquema interpretativo sobre el que se señala que la región no replicada representa un 0.186 de la molécula mientras que un 0.814 corresponde a cada dúplex hijo; pues en estos plásmidos las horquillas de replicación se detienen cuando han recorrido aproximadamente un 80% de la molécula. En B, C, D y E se muestran imágenes de RIs con cruces.

La figura 29 sirve para ilustrar la importancia de asignar la mano y el signo a cada uno de los cruces de un RIs para determinar si realmente está anudado. Ambas moléculas presentan tres cruces cada una pero no están anudadas.

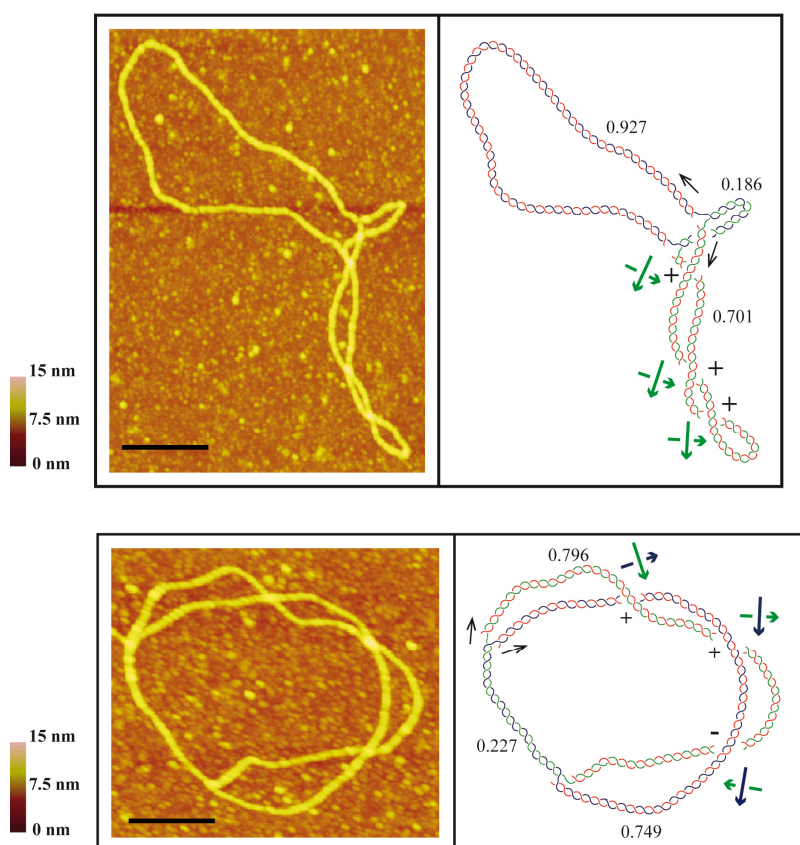


Figura 29. El estudio de cada cruce permite discernir si se trata o no de un RI anudado. Las micrografías corresponden a RIs de pBR-TerE@*DraI* que, pese a presentar tres cruces, no están anudados. A lado de cada cruce se indica la mano con flechas verdes y azules, y el signo del mismo. La barra representa 250 nm y la escala de altura fue de 15nm.

En la figura 30 se muestran tres RIs que sí presentan nudos entre las cromátidas hermanas. Los mostrados tanto en 30A como en 30B son nudos de tres cruces pero de distinto signo. El RI mostrado en 30C presenta cuatro cruces pero uno de ellos se puede deshacer y son los tres restantes los que dan lugar a un nudo de tres cruces de signo positivo.

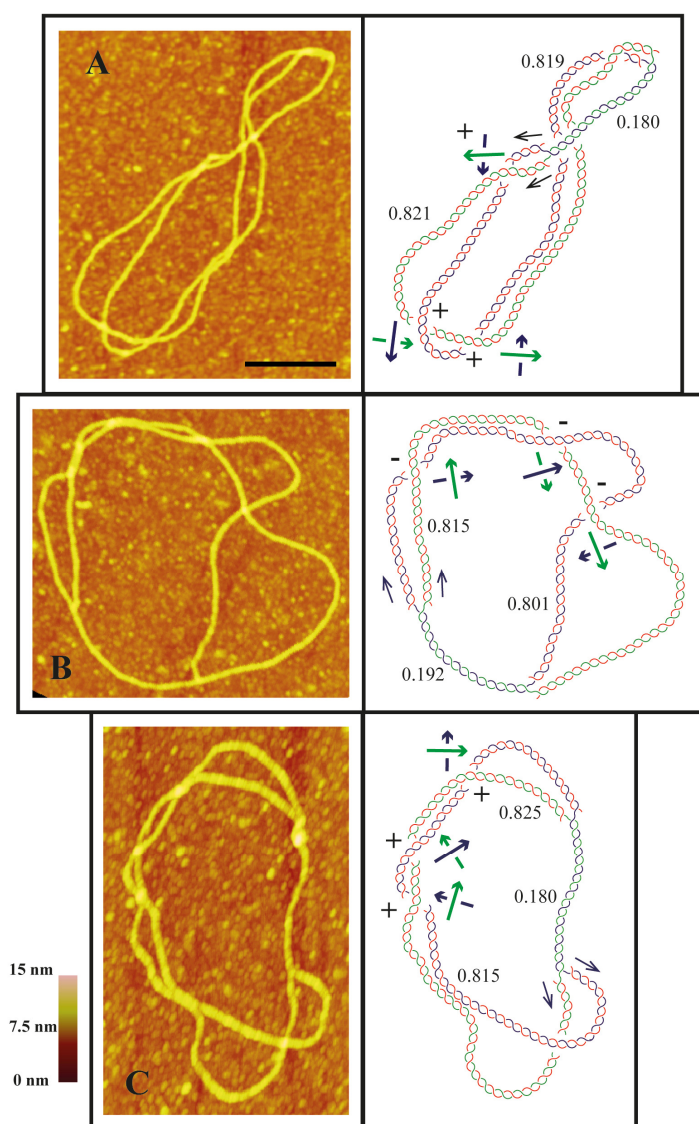


Figura 30. Visualización de RIs anudados de pBR-TerE@DraI mediante TM-AFM. En A y B se muestran dos RIs cada uno con un nudo de tres cruces pero de distinto signo. El RI mostrado en C presenta cuatro cruces y tres de ellos conforman un nudo de tipo *trefoil*. La barra representa 250 nm y la escala para el dato de altura fue de 15 nm.

4.11. Estudio del destino de las moléculas anudadas al término de la replicación.

Una vez que se ha completado la replicación, los cruces a modo de pre-encadenamiento entre las cromátidas hermanas se convierten en encadenamiento que la Topo IV se encarga de resolver para permitir la correcta segregación de los dúplex hijos (Zechiedrich and Cozzarelli, 1995; Zechiedrich et al., 1997; Lucas et al., 2001). De igual modo, los cruces de los nudos surgidos entre las cromátidas hermanas en los RIs pasan a convertirse en encadenamiento al final de la replicación y se resuelven como tales.

En la zona superior de las autorradiografías de la figura 15, correspondientes al análisis de RIs intactos de los tres plásmidos crecidos en la estirpe parE10 a la temperatura restrictiva y tratados con endonucleasas de cadena sencilla fuera de su región replicada, se hace evidente la presencia de dos arcos o familias diferentes de topoisómeros. La familia más abundante (coloreada en naranja en los diagramas) muestra menos movilidad electroforética en primera dimensión y corresponde a los Cat A. En cuanto a la familia menos abundante (en color morado), que migró más durante la primera dimensión, existen dos posibles interpretaciones. Por un lado, podría tratarse de dímeros anudados como señalan los trabajos de Martín-Parras y colaboradores y de Martínez-Robles y colaboradores (Martin-Parras et al., 1998; Martinez-Robles et al., 2009). Por otro lado, tal y como sugieren Adams y colaboradores (Adams et al., 1992) es posible que esa familia corresponda a encadenados en donde uno de los monómeros presenta un nudo. El origen de tales monómeros anudados podría hallarse en los nudos intra-cromátida que tienen lugar en los RIs y que no habrían sido resueltos por la Topo IV; a diferencia de lo que sucede con los nudos inter-cromátidas que la enzima resuelve como si se tratase de encadenados para asegurar la correcta segregación de las moléculas hijas.

Dado que los plásmidos del experimento anterior presentan un impedimento para el avance de la horquilla de replicación (el terminador *TerE* localizado a distintas distancias del origen) cabría interpretar que la aparición de ese segundo arco sólo tiene lugar cuando está impedida o afectada de algún modo la progresión de la horquilla. Para tratar de dilucidar si ese era el caso, realizamos una serie de experimentos empleando el plásmido pBR18, que no contiene ninguna barrera o impedimento para el avance de la horquilla.

En la figura 31 se muestra la autorradiografía del gel bidimensional de pBR18 crecido a 42°C durante 1 hora en células C600parC1215 y tratado con *Nb.BsmI*. De nuevo se puede apreciar la presencia del segundo arco pese a que en este plásmido no existe ningún obstáculo para el progreso de la horquilla de replicación.

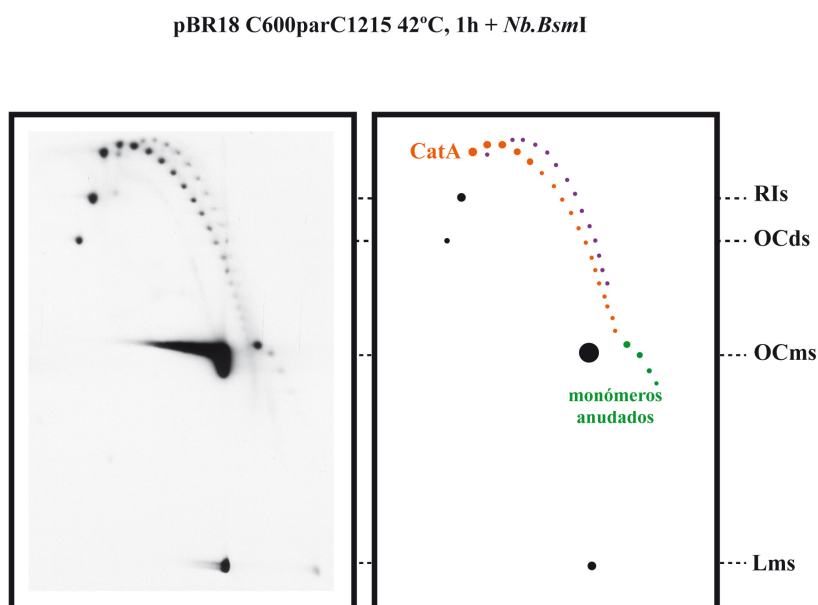


Figura 31. Análisis del plásmido pBR18 crecido en la estirpe C600parC1215 a la temperatura restrictiva y tratado con *Nb.BsmI*. A la derecha de la autorradiografía se muestra el correspondiente diagrama interpretativo. Además de los Cat A (arco de color naranja) se puede apreciar la presencia del segundo arco (en color morado) pese a que en este plásmido no existe ningún bloqueo de la horquilla de replicación.

Las células C600parC1215 poseen una mutación termosensible en el gen *parC* de la Topo IV que hace que la enzima se inhiba a la temperatura restrictiva de 42°C. A diferencia de la estirpe parE10, también termosensible y empleada anteriormente, la C600parC1215 no es defectiva en la proteína RecA, de manera que presenta multímeros. Esta última característica resultó de gran utilidad para el siguiente experimento que consistió en determinar si el segundo arco correspondía o no a dímeros anudados. Para tal propósito se sometió una muestra de pBR18 idéntica a la del experimento anterior a una electroforesis bidimensional en la que se realizó una digestión parcial en gel con *EcoRI* antes la segunda dimensión (ver apartado 3.9.3 de Materiales y Métodos).

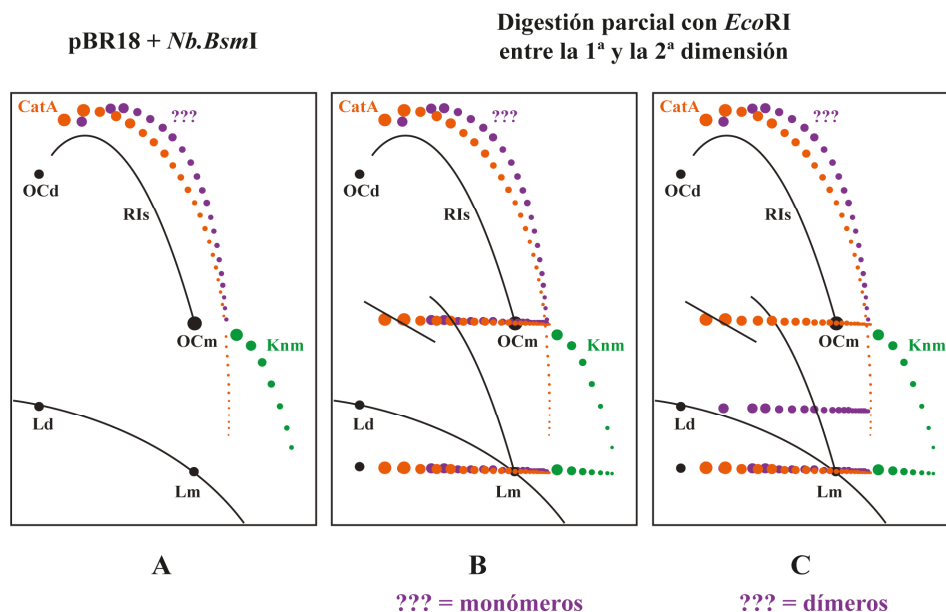


Figura 32. Diagramas representativos del resultado de la electroforesis bidimensional tras la digestión parcial con *EcoRI* antes de la segunda dimensión. En A se muestra el diagrama de la muestra control de pBR18 crecida en C600parC1215 a 42°C, una hora y tratada con la endonucleasa de cadena sencilla pero sin digerir en gel. Los diagramas en B y C muestran los distintos resultados tras la digestión en gel antes de la segunda dimensión dependiendo de si el segundo arco corresponde a encadenados o a dímeros anudados, respectivamente.

En la figura 32 se muestran los diagramas con los distintos resultados esperados en función de la identidad del segundo arco. Dado que pBR18 posee un solo sitio de reconocimiento para *EcoRI*, cuando la digestión parcial afecta a cualquiera de los dos monómeros componentes de un Cat A, ese monómero se convierte en un lineal y pasa a migrar a la altura de los Lms; mientras que el otro componente del Cat A, no digerido, se libera del encadenamiento como un monómero relajado y pasa a migrar a la altura de los OCms. En cuanto al segundo arco (en color morado), si estuviese formado por encadenados en donde uno de los monómeros presenta un nudo (figura 32B), una digestión parcial convertiría a ese monómero anudado en un lineal. En cambio, cuando la digestión afectase al otro componente no anudado ese se convertiría en un lineal, mientras que el monómero anudado se liberaría del encadenamiento y pasaría a migrar a la altura del monómero anudado (Knm) con el número de cruces correspondiente. No obstante, cabe destacar que es muy probable que no fuese posible detectar el rastro de dicha migración ya que los elementos de este segundo arco representan una minoría dentro de la población

total de moléculas presentes en el gel. Además, el primer monómero anudado (el más abundante, con un nudo de tres cruces) migra en segunda dimensión a la misma altura que las OCs y es ahí donde pasarían a migrar la mayoría de los monómeros anudados no digeridos componentes de ese segundo arco de encadenados; de tal manera que el rastro de los monómeros anudados se solaparía con el de los OCs provenientes de la digestión parcial de los Cat A. Finalmente, si el segundo arco correspondiese a dímeros anudados (figura 32C), estos presentarían dos sitios de reconocimiento para *EcoRI*. Entonces, en unos casos la digestión parcial con la enzima afectaría solo a uno de sus sitios y se liberaría el dímero linearizado, que pasaría a migrar a la altura de la señal de Ld; mientras que en otras moléculas la enzima actuaría en sus dos sitios de reconocimiento y se liberarían los dos monómeros linearizados que migrarían a la altura de los Lm.

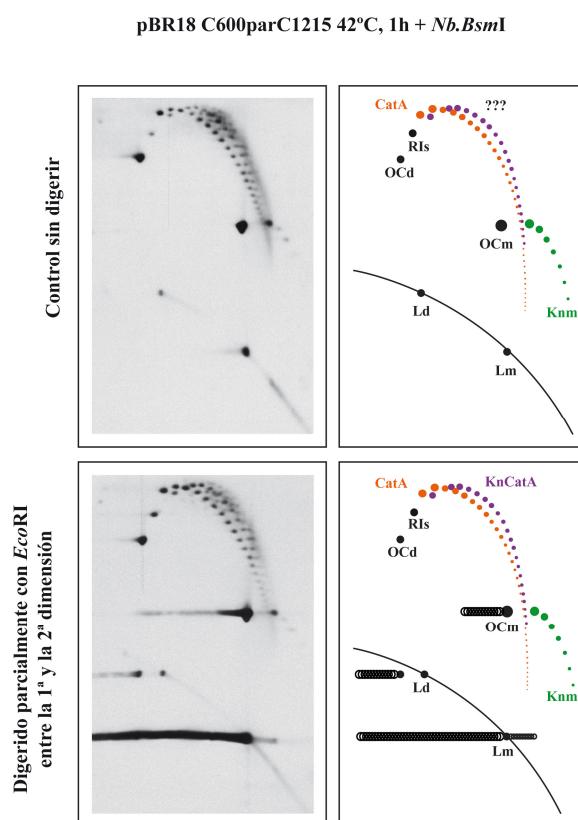


Figura 33. Análisis mediante digestión en gel del DNA de pBR18 crecido en la estirpe C600parC1215 a la temperatura restrictiva y tratado con la endonucleasa de cadena sencilla *Nb.BsmI*. A: autorradiografía del control que se trató de forma idéntica al fragmento de gel digerido pero sin añadir la enzima. B: resultado de la digestión parcial en gel, entre la primera y la segunda dimensión, con *EcoRI*. La comparación con los diagramas de la figura 32 permite concluir que el segundo arco no está formado por dímeros anudados.

En la figura 33 se muestran el control sin digerir (A) y el resultado de la digestión parcial con *EcoRI* antes de la segunda dimensión (B). A la vista de este último podemos concluir que el segundo arco no corresponde a dímeros anudados.

La transformación de células de las estirpes DS9039 y N4971 con pBR18 sirvió para confirmar que ese segundo arco no se debe a dímeros anudados surgidos como intermediarios en procesos de recombinación. Ambas estirpes carecen de las proteínas implicadas en procesos de recombinación XerD o RuvA, RuvB, RuvC y RecG, respectivamente.

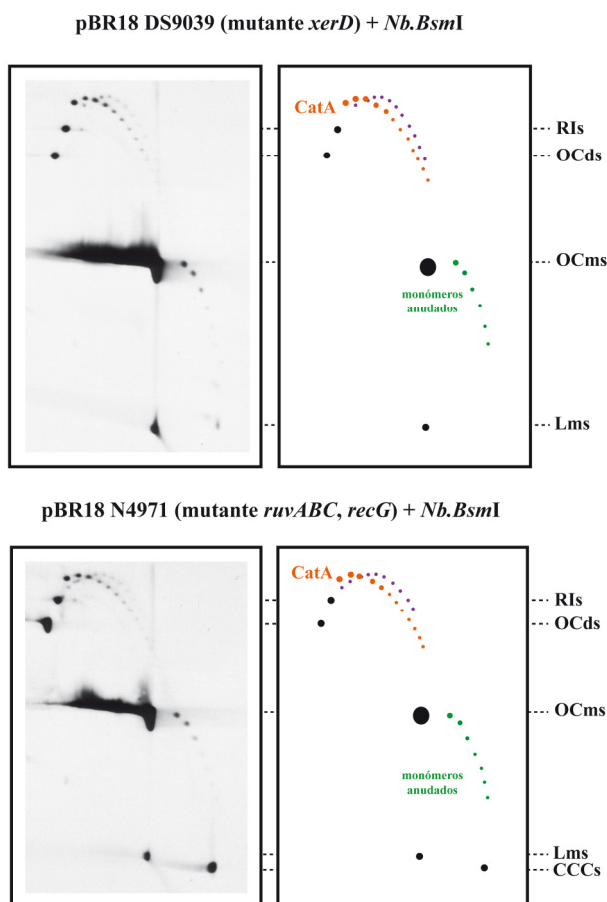


Figura 34. Análisis del plásmido pBR18 crecido en las estirpes DS9039 y N4971. Los geles bidimensionales realizados tras la digestión parcial con *Nb.BsmI* (se aprecian restos de CCCs) muestran que, además del arco de Cat A (de color naranja), sigue estando presente el segundo arco (morado) pese a que ambas estirpes son defectivas en sendos sistemas de recombinación.

Los geles bidimensionales en la figura 34 muestran que el segundo arco sigue estando presente pese a que en las células no operan los correspondientes sistemas de recombinación. Es decir ese segundo arco no está constituido por dímeros anudados surgidos durante el desencadenamiento de monómeros por parte del sistema XerCD o como consecuencia de procesos de recombinación en los que intervienen las proteínas RuvA, RuvB, RuvC y RecG.

4.12. Estudio de la topología del minicromosoma pRS316 a lo largo del ciclo celular en cultivos sincronizados de *S. cerevisiae*.

En eucariotas, la mayoría de las uniones topológicas entre las hebras del DNA son eliminadas durante la replicación por la acción de las topoisomerasas I y II (Wang, 2002). No obstante, muchas de esas uniones dan como resultado moléculas de DNA encadenadas una vez completada la replicación (Sundin and Varshavsky, 1980, 1981). Dicho encadenamiento sólo puede ser resuelto por la Top2 (Holm et al., 1985). Dado que se requieren los husos mitóticos para que el desencadenamiento sea completo, se asume que éste ocurre sólo tras la segregación cromosómica durante la anafase (Holm et al., 1985). Sin embargo, las cromátidas hermanas parecen estar completamente desencadenadas antes de su separación física por parte del huso (Uhlmann et al., 2000; Oliveira et al., 2010).

En procariotas se ha demostrado que el ΔW r promueve el desencadenamiento por parte de la Topo IV (Zechiedrich et al., 1997; Hardy et al., 2004; Martinez-Robles et al., 2009). Nos preguntamos entonces si en células eucariotas los cambios topológicos en el DNA durante la mitosis contribuyen al desencadenamiento. Para estudiarlo analizamos la topología del DNA *in vivo* mediante pRS316, un minicromosoma que contiene un origen de replicación de levaduras y un centrómero y cuyo comportamiento a la hora de segregar imita el de los cromosomas endógenos. Las moléculas de pRS316 son en su mayoría desencadenadas poco después de la replicación del DNA en presencia de niveles normales de Top2 (Figura 35A); de manera que, para obtener una población enriquecida en DNA encadenado que pudiera ser examinado a lo largo de las distintas etapas del ciclo celular, empleamos una estirpe con un degron Top2 inducible por temperatura (Baxter and Diffley,

2008). La replicación del DNA de pRS316 en ausencia de Top2 lleva a la acumulación de Cat C en donde ambos monómeros presentan ΔW_r (-).

4.12.1. Estudio de la movilidad electroforética en geles unidimensionales de pRS316 durante el ciclo celular en presencia o ausencia de Top2.

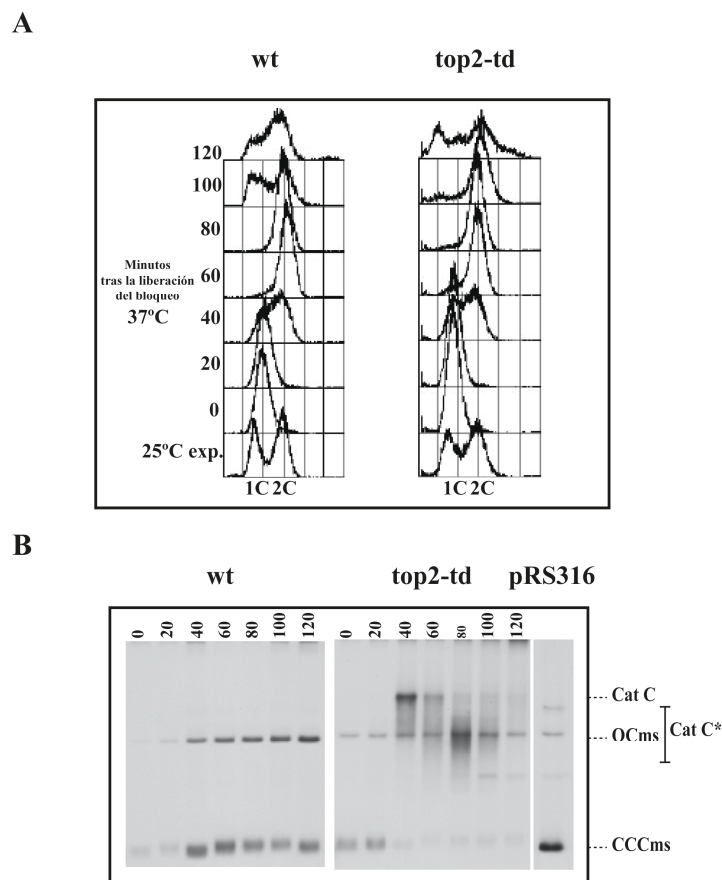


Figura 35. Los minicromosomas encadenados experimentan un cambio topológico *in vivo* durante la mitosis. Células silvestres y de la estirpe top2-td se bloquearon con α -factor con un contenido de DNA equivalente a la fase G1 y la proteína Top2-td fue degradada. A continuación se liberaron las células de forma sincrónica en el ciclo celular y se analizaron a intervalos regulares. Se tomaron muestras en la fase de crecimiento exponencial (25°C), antes de liberarlas del bloqueo en G1 (0), y a los distintos tiempos que aparecen indicados para el análisis del contenido en DNA mediante FACS (A) y el estudio de la topología del plásmido (B) mediante electroforesis unidimensional en geles de agarosa al 0.8%. En la autorradiografía se indica la movilidad electroforética de los CCCs y OCs de monómeros y de los Cat C. Mediante una barra se indica la transición de Cat C a Cat C*. Como control se analizó en las mismas condiciones una muestra de 5 ng de DNA monomérico y superenrollado de pRS316 aislado de *E. coli*.

Al estudiar la movilidad electroforética, en un gel unidimensional, de este minicromosoma en un cultivo sincronizado de la estirpe top2-td observamos un cambio significativo en la movilidad de los Cat C entre 40 y 80 minutos, cuando las células empezaron a entrar en anafase (Figura 35B). Pasamos entonces a designar como Cat C a los encadenados de tipo C pre-mitóticos, y como Cat C* a la forma mitótica de los mismos.

4.12.2. Estudio de la movilidad electroforética en geles bidimensionales de pRS316 durante la fase S del ciclo celular en la estirpe top2-td.

Decidimos emplear la electroforesis bidimensional en geles de agarosa para analizar con mayor resolución las diferentes formas topológicas de pRS316 durante la replicación en ausencia de Top2, es decir, entre los minutos 20 y 40 del ciclo celular. Para ello, células de la estirpe top2-td se bloquearon con α -factor en G1 (esto es, con un contenido de DNA equivalente a G1) y la proteína Top2-td fue degradada. A continuación se liberaron las células de forma sincrónica en el ciclo celular y se tomaron muestras en la fase de crecimiento exponencial (25°C), antes de liberarlas del bloqueo (0), y entre los tiempos 20 y 40 a intervalos de 5 minutos. Alícuotas de estas últimas muestras (de 20, 25, 30, 35 y 40 minutos) se sometieron a electroforesis bidimensional en geles de agarosa. El resultado se muestra en la figura 36. Ya en el minuto 20 se empiezan a detectar Cat C. A partir del minuto 30 su presencia se hace patente al tiempo que se detectan también los otros dos tipos de encadenados, Cat B y Cat A.

Para verificar la acumulación de Cat C a partir del minuto 30, incubamos las muestras con *Nt.Bpu10I* y las sometimos a electroforesis bidimensional tal y como se muestra en la figura 37. El tratamiento con esta endonucleasa elimina todo el ΔW_r presente en los Cat C y Cat B convirtiéndolos en Cat A. Sobre el arco único de Cat A se puede medir el número de cruces de los encadenados ya que la movilidad de cada topoisómero es proporcional al número de cruces intermoleculares entre los plásmidos. Desde el primer topoisómero del arco (localizado en el extremo superior izquierdo de la autorradiografía) hasta el último, por debajo de las OCs de monómeros, se pueden contar en torno a treinta.

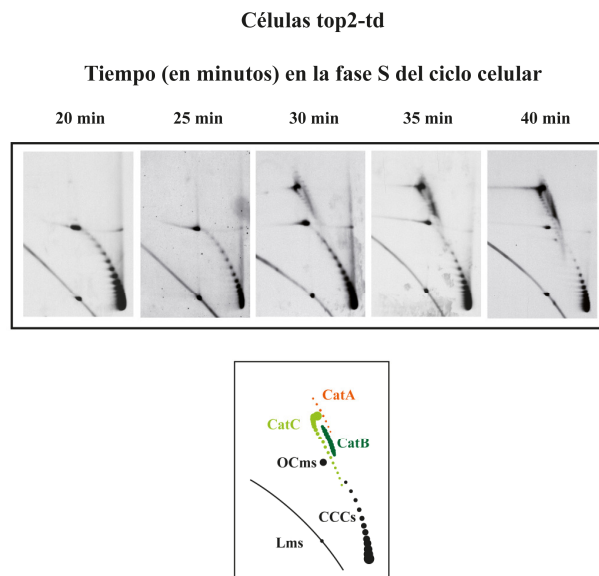


Figura 36. Análisis de las formas intactas de pRS316, aislado de células top2-td de *S. cerevisiae*, mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa. Se muestran las autorradiografías de las muestras transcurridos 20, 25, 30, 35 y 40 minutos en la fase S, así como un esquema interpretativo en donde las señales de las formas no replicadas se representan en color negro y las de las moléculas encadenadas, Cat A, Cat B y Cat C, se representan en naranja, verde oscuro y verde claro, respectivamente.

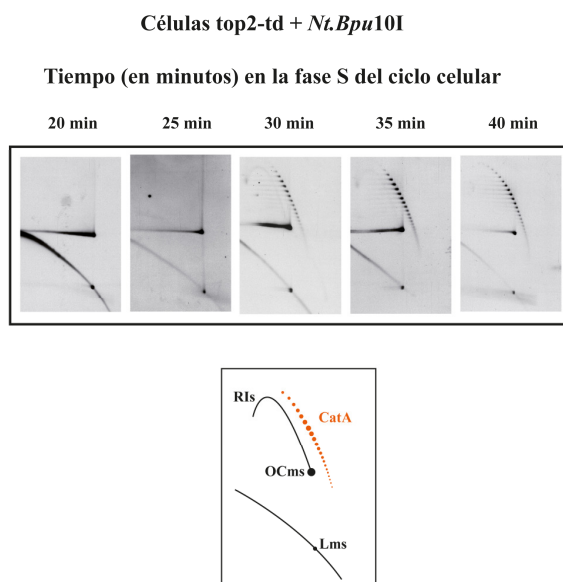


Figura 37. Análisis de pRS316, aislado de células top2-td de *S. cerevisiae*, mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa tras el tratamiento con la endonucleasa de cadena sencilla *Nt.Bpu10I*. Se muestran las autorradiografías de las muestras correspondientes a 20, 25, 30, 35 y 40 minutos en la fase S. En el esquema interpretativo de las señales se sigue el mismo patrón de color empleado en la figura 36.

4.12.3. Estudio de la movilidad electroforética en geles bidimensionales de pRS316 durante la mitosis en la estirpe top2-td.

Tras el análisis de muestras del plásmido durante la replicación en ausencia de Top2 y teniendo en cuenta que la transición de Cat C a Cat C* se produce entre los minutos 40 y 80, el siguiente paso consistió en estudiar mediante electroforesis bidimensional las formas topológicas en una muestra del mismo cultivo recogida a los 80 minutos.

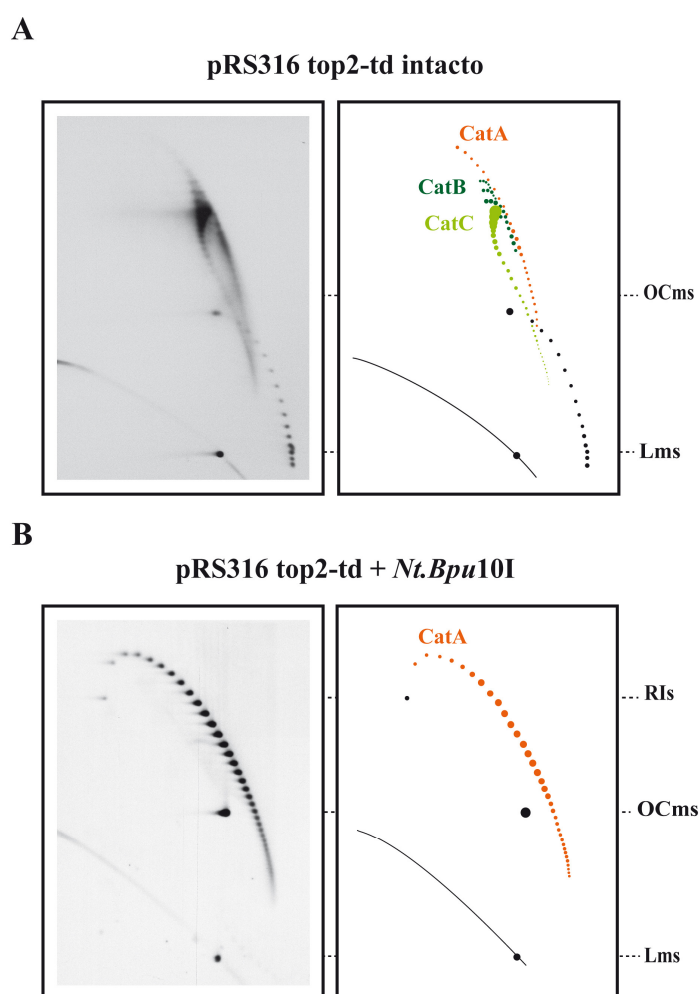


Figura 38. Análisis mediante electroforesis bidimensional de pRS316 intacto y tratado con *Nt.Bpu10I*, tras 80 minutos de la liberación de las células top2-td de forma sincrónica en el ciclo celular. Se muestran las autorradiografías de la muestra intacta (A) y tras el tratamiento con *Nt.Bpu10I* durante 1 hora a 37°C (B). En los esquemas interpretativos los códigos de color para representar las distintas señales son los mismos que en figuras anteriores.

Como en el apartado anterior, analizamos tanto las formas intactas (figura 38A) como las tratadas con *Nt.Bpu10I* (figura 38B). Comparando ambas autorradiografías con las del minuto 40, en las figuras 36 y 37, se puede apreciar que a los 80 minutos hay una mayor acumulación de Cat C (figura 38A) pero el número de cruces, que se pueden contar en los Cat A (figura 38B), está en torno a treinta en ambos casos.

4.12.4. Estudio de la movilidad electroforética de pRS316 en geles unidimensionales durante el ciclo celular en la estirpe con el doble degenon top2-td cdc20-td.

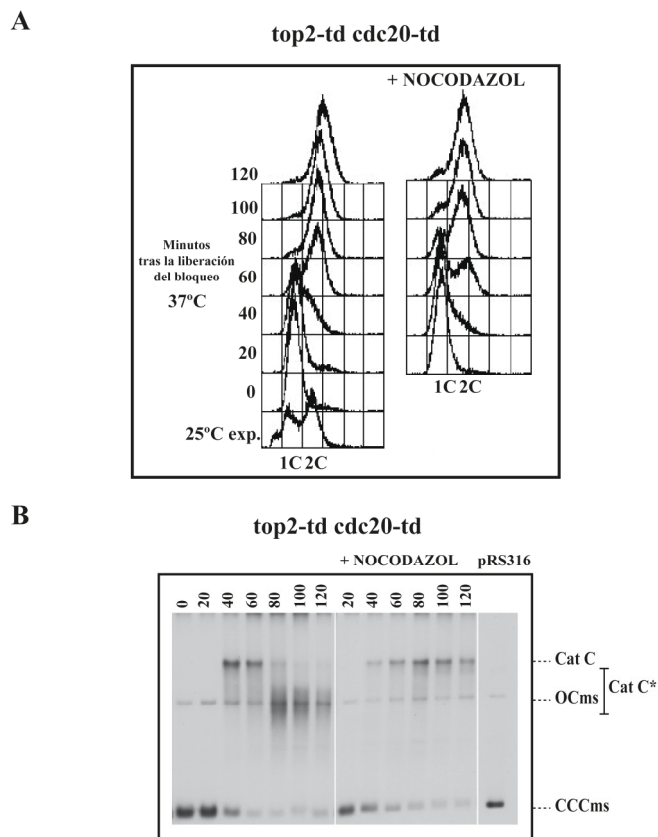


Figura 39. Los minicromosomas encadenados experimentan una transición topológica *in vivo* tras la formación del huso mitótico. Células de la estirpe con el doble degenon top2-td cdc20-td se procesaron como en la figura 34, pero fueron bloqueadas antes de anafase mediante la depleción de Cdc20 o bien mediante el tratamiento con nocodazol además de la depleción de Cdc20. Se tomaron muestras en la fase de crecimiento exponencial (25°C), antes de liberarlas del bloqueo en G1 (0), y a los distintos tiempos indicados. El análisis del contenido en DNA mediante FACS sirvió para confirmar que la replicación del DNA tuvo lugar con la cinética habitual (A). En la autorradiografía mostrada en B se puede observar que la transición de Cat C a Cat C* sólo tuvo lugar en las células en medio sin nocodazol.

Para comprobar si la transición de Cat C a Cat C* coincidía o no con la segregación cromosómica empleamos la estirpe con el doble *degron top2-td cdc20-td*. Las células fueron bloqueadas en metafase mediante la degradación de la proteína Cdc20 fusionada con el sistema *degron* o mediante la adición de nocodazol al medio además de la depleción de Cdc20. El nocodazol es una droga que impide la formación del huso mitótico al interferir en la polimerización de los microtúbulos. Como se puede comprobar en el gel unidimensional de la figura 39B, la aparición de Cat C* ocurrió en las células bloqueadas en metafase con el *degron* (a la izquierda) pero no en aquellas bloqueadas con nocodazol (a la derecha). Lo anterior indica que la transición de Cat C a Cat C* tiene lugar antes del comienzo de la anafase y que los husos mitóticos se requieren para dicha la transición.

4.12.5. Estudio de la topología de las formas intactas de pRS316 durante la mitosis en células de las estirpes *top2-td* y *top2-td cdc20-td*.

El siguiente paso consistió en comprobar si la transición de Cat C a Cat C* estaba relacionada con algún cambio en el ΔW_r . Para ello analizamos la topología de muestras de DNA enriquecidas en uno u otro tipo de encadenado.

La muestra enriquecida en Cat C se obtuvo creciendo células *top2-td* en medio con nocodazol y, por tanto, sin husos mitóticos. La muestra enriquecida en Cat C* se consiguió mediante el bloqueo con Cdc20-td de células de la estirpe *top2-td cdc20-td* en ausencia de nocodazol y en las que, por tanto, sí se formaron husos mitóticos. Se recogieron muestras de DNA 80 minutos tras la liberación de las células de forma sincrónica en el ciclo celular y se analizaron mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa. El resultado aparece en la figura 40, en donde es posible apreciar una variación en la migración de los Cat B y Cat C según se trate de la muestra obtenida en ausencia o en presencia de husos mitóticos.

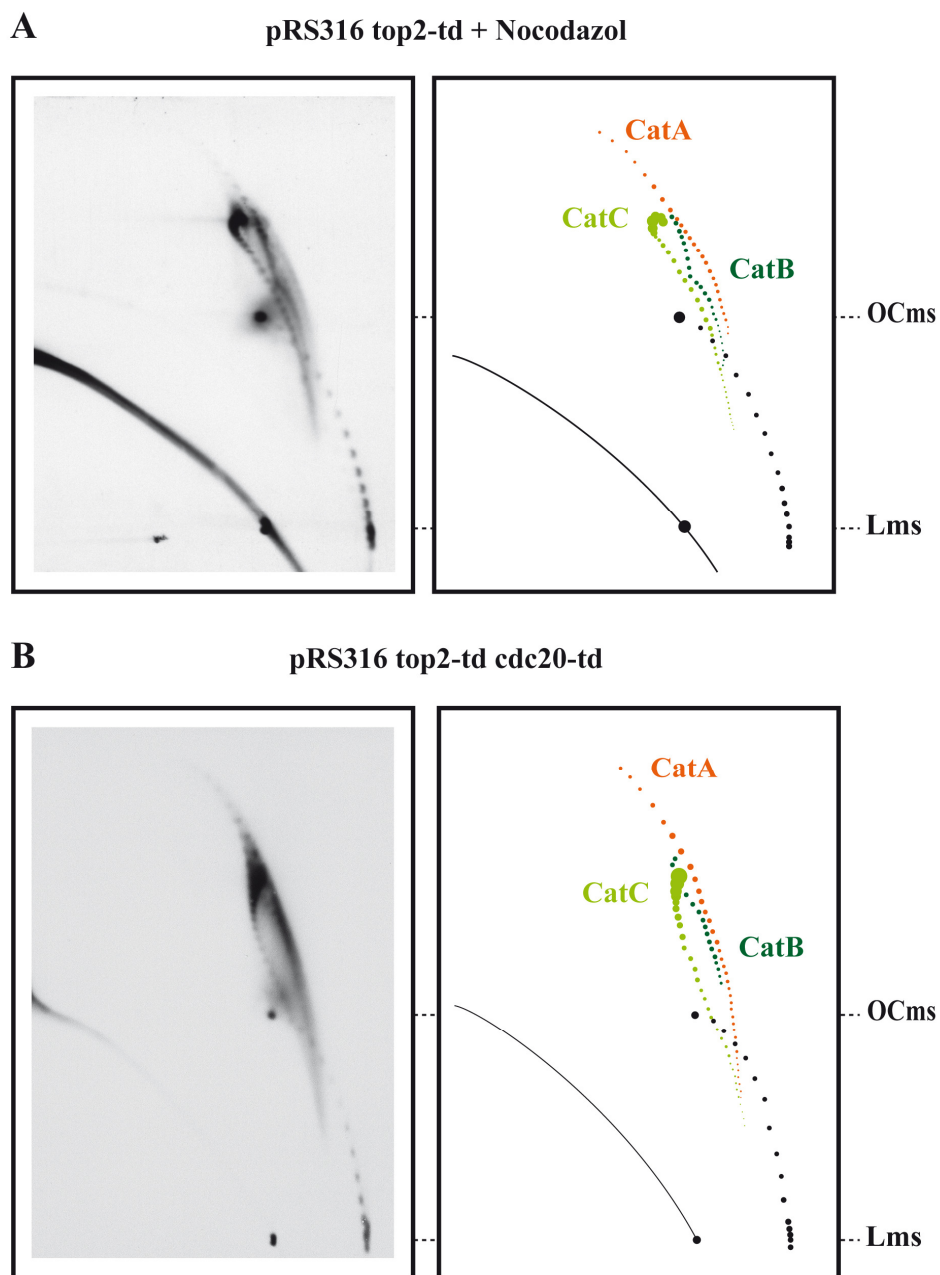


Figura 40. Análisis mediante electroforesis bidimensional de las formas intactas de pRS316 aislado de células top2-td y de células con el doble degren, top2-td cdc20-td, crecidas en presencia o ausencia de nocodazol. A: autorradiografía y diagrama interpretativo correspondientes a la muestra de pRS316 enriquecida en Cat C en la estirpe top2-td mediante el bloqueo con nocodazol. **B:** autorradiografía y diagrama de la muestra enriquecida en Cat C* mediante el bloqueo con Cdc20-td en la estirpe con el doble degren. Como en los diagramas anteriores, las señales de las formas no replicadas se representan en color negro y las de Cat A, Cat B y Cat C se representan en naranja, verde oscuro y verde claro, respectivamente.

4.12.6. Estudio de la topología de pRS316 durante la mitosis en células top2-td y top2-td cdc20-td mediante geles bidimensionales de agarosa en presencia de un agente intercalante.

En el experimento anterior pudimos detectar una diferencia en el grado de ΔW_r entre Cat C y Cat C*. No obstante, los geles bidimensionales realizados hasta ese momento no nos permitían distinguir todos los topoisómeros presentes en ambos tipos muestras y con ello la naturaleza exacta de esa diferencia en ΔW_r . Por ello, decidimos llevar a cabo los geles bidimensionales en presencia de un agente intercalante. La cloroquina es una molécula de estructura plana y de pequeño tamaño que se intercala entre las dos hebras de la doble-hélice del DNA, provocando un desenrollamiento parcial de la molécula en el sitio en el que se intercala. En el caso de plásmidos circulares con un ΔW_r (-) nativo, ese desenrollamiento hace que adquieran un ΔW_r igual a cero, y a partir de ese momento la incorporación de cantidades crecientes de cloroquina hace que los plásmidos adquieran ΔW_r (+) (Bauer and Vinograd, 1968). Así pues, con el fin de comprobar el tipo de ΔW_r que presentan los minicromosomas aislados de las estirpes top2-td tratada con nocodazol y top2-td cdc20-td, analizamos el DNA intacto de ambas poblaciones en geles bidimensionales en donde la segunda dimensión transcurrió en presencia de distintas concentraciones de cloroquina. Se realizaron dos experimentos variando únicamente la concentración de cloroquina durante la segunda dimensión: 1 $\mu\text{g/ml}$ y 20 $\mu\text{g/ml}$ (figuras 41 y 42, respectivamente). Para elegir la máxima concentración se tuvo en cuenta el efecto del agente intercalante sobre los TopCCCs, de manera que se empleó la mínima concentración requerida para que la mayoría de ellos volvieran a adquirir una movilidad electroforética similar a la que presentaban en ausencia de cloroquina. En ambas autorradiografías se puede comprobar que la incorporación de cloroquina prácticamente no afecta a la movilidad de los OCs y Ls ya que estas moléculas no albergan ΔW_r .

En los geles de la figura 41, donde la segunda dimensión transcurrió en presencia de 1 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina, la movilidad de los TopCCCs en las dos muestras disminuyó hasta tal punto que algunos mostraron la misma movilidad que los OCs. En la figura 42, se observa que con la concentración más alta de cloroquina (20 $\mu\text{g/ml}$) los TopCCCs volvieron a ganar movilidad y un número significativo de los mismos mostraron la misma

que tenían en ausencia de cloroquina. En cuanto a los encadenados, su respuesta al agente intercalante en segunda dimensión fue significativamente distinta en una y otra estirpe. Esa diferencia en el comportamiento electroforético se apreció especialmente en presencia de la concentración más baja de cloroquina: gran parte de la población de Cat C de las células top2-td, crecidas en presencia de nocodazol, adquirió una mayor movilidad electroforética (figura 41A) en comparación con los Cat C* en células top2-td cdc20-td (figura 41B).

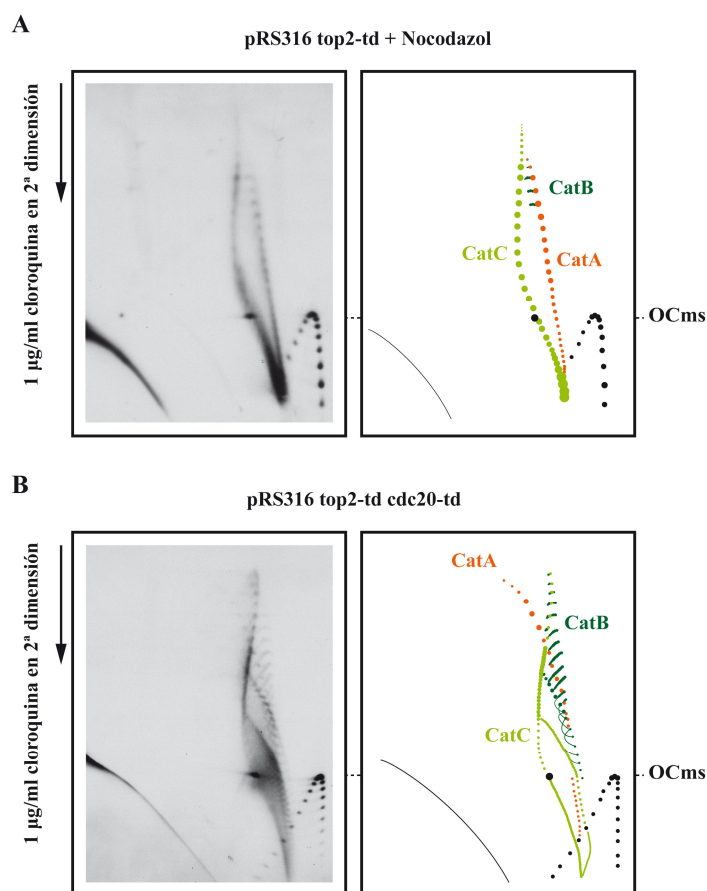


Figura 41. Análisis del DNA intacto de pRS316 mediante geles bidimensionales en donde la segunda dimensión tuvo lugar en presencia de 1 µg/ml de cloroquina. A: Autorradiografía y esquema interpretativo del resultado para la muestra de DNA obtenida de células top2-td tratadas con nocodazol. **B:** Autorradiografía y esquema del resultado obtenido para la muestra de DNA extraída de células con el doble de gen. En los esquemas se sigue el mismo patrón empleado hasta ahora de manera que los Cat A se representan en color naranja, y Cat B y Cat C en color verde oscuro y claro, respectivamente. Se observa que el empleo de esta baja concentración de agente intercalante en segunda dimensión permite resolver mejor estos tres tipos de encadenados.

En cuanto a la concentración alta de cloroquina (figura 42), no demostró ser de tanta utilidad a la hora de dilucidar las diferencias entre ambos tipos de encadenados.

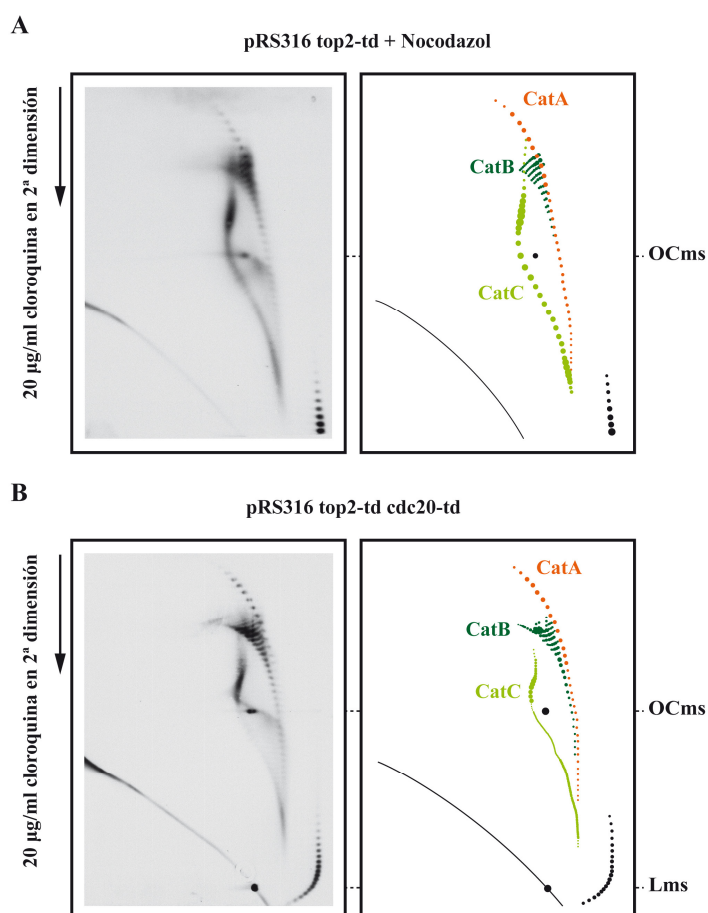


Figura 42. Análisis del DNA intacto de pRS316 mediante geles bidimensionales en donde la segunda dimensión tuvo lugar en presencia de 20 µg/ml de cloroquina. A: Autorradiografía y esquema interpretativo del resultado para la muestra de DNA obtenida de células top2-td tratadas con nocodazol. **B:** Autorradiografía y esquema del resultado obtenido para la muestra de DNA extraída de células top2-td cdc20-td. En los esquemas de nuevo los Cat A se representan en color naranja, y Cat B y Cat C en color verde oscuro y claro, respectivamente.

En definitiva, la utilización de una baja concentración de cloroquina durante la segunda dimensión, si bien nos permitió separar y distinguir mejor las tres poblaciones de encadenados, no arrojó demasiada luz acerca del origen de las diferencias en movilidad electroforética observadas entre los Cat C y Cat C*.

Decidimos entonces emplear una baja concentración de cloroquina (0.5 $\mu\text{g/ml}$) exclusivamente durante la primera dimensión. Las autorradiografías correspondientes a los geles bidimensionales en ambas estirpes se muestran en la figura 43.

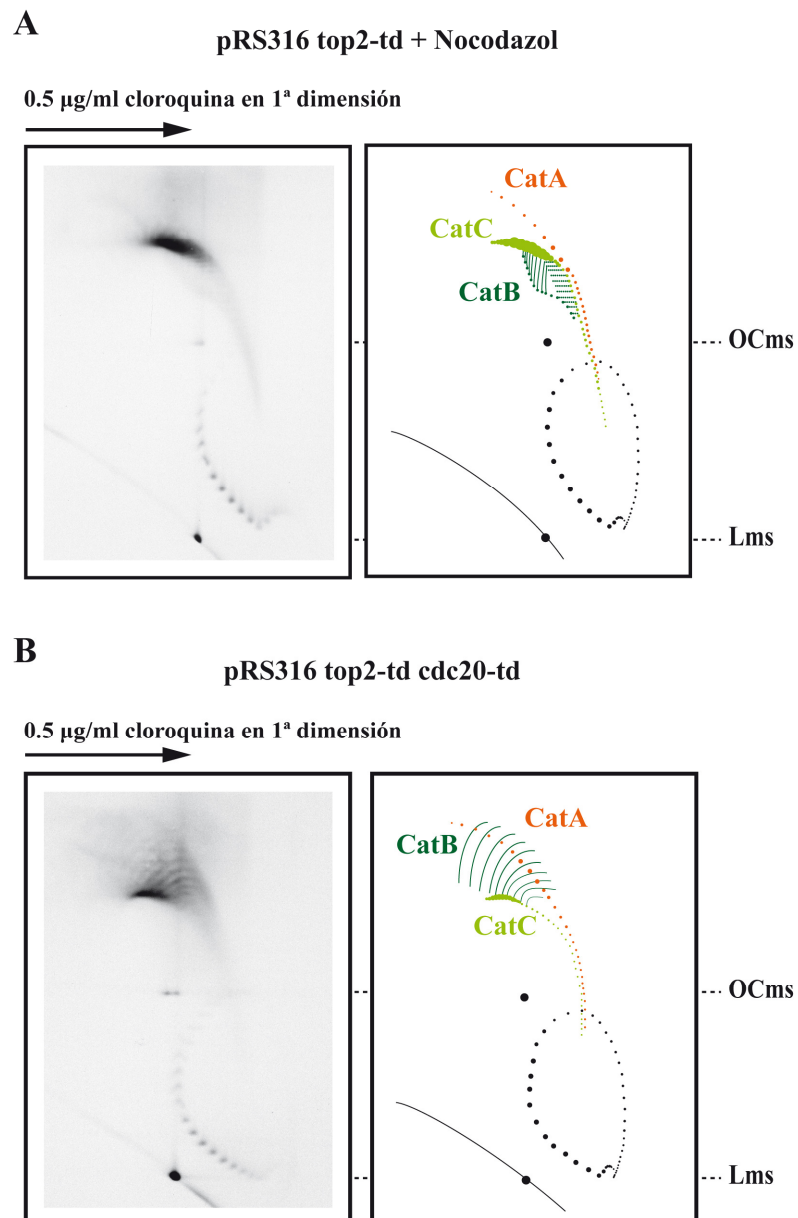


Figura 43. Análisis del DNA intacto de pRS316 mediante geles bidimensionales en donde la primera dimensión transcurrió en presencia de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina. A: resultado del análisis del DNA de las células top2-td tratadas con nocodazol. **B:** resultado del análisis del DNA en células de la estirpe top2-td cdc20-td en donde se observa que los Cat B, procedentes de los Cat C*, responden como si la cloroquina les hubiera añadido más ΔWr en primera dimensión, tal y como se espera de moléculas con ΔWr (+).

La ausencia de cloroquina en segunda dimensión hizo que tanto los TopCCCs como los Cat C y Cat B recuperaran, durante el transcurso de la misma, la movilidad que tendrían en ausencia de agentes intercalantes, con independencia de la concentración de cloroquina a la que fueron expuestos durante la primera dimensión. El empleo de cloroquina en primera dimensión permitió mejorar significativamente la resolución, especialmente de los topoisómeros Cat B. De hecho, el comportamiento electroforético de esos Cat B fue radicalmente distinto entre las estirpes top2-td tratada con nocodazol (Cat C) y top2-td cdc20-td (Cat C*), de tal manera que en esta última la respuesta de los Cat B a cloroquina fue la propia de moléculas con ΔW_r (+).

Nos percatamos entonces de que la diferencia entre Cat C y Cat C* se podría desentrañar más fácilmente analizando el comportamiento electroforético de los Cat B resultantes de la introducción de roturas de cadena sencilla, tal y como se describe en el siguiente apartado.

4.12.7. Estudio de la topología de pRS316 durante la mitosis en células top2-td y top2-td cdc20-td mediante geles bidimensionales de agarosa en presencia de cloroquina y tras la digestión parcial con *Nt.Bpu10I*.

El empleo de una baja concentración de cloroquina en primera dimensión apuntó a que las diferencias topológicas entre Cat C y Cat C* podrían deberse a diferencias en el tipo de ΔW_r (negativo o positivo). No obstante, la complejidad inherente a este tipo de encadenados, en donde ambos monómeros pueden albergar ΔW_r y, por tanto, verse afectados por la cloroquina, dificulta en gran medida la labor de desentrañar el origen de esas diferencias topológicas.

Para facilitar el análisis topológico sometimos las muestras enriquecidas en uno u otro tipo de encadenado a una digestión parcial con la endonucleasa de cadena sencilla *Nt.Bpu10I*, de manera que parte de los mismos se convirtiesen en Cat B en donde sólo uno de los monómeros está covalentemente cerrado y puede albergar ΔW_r .

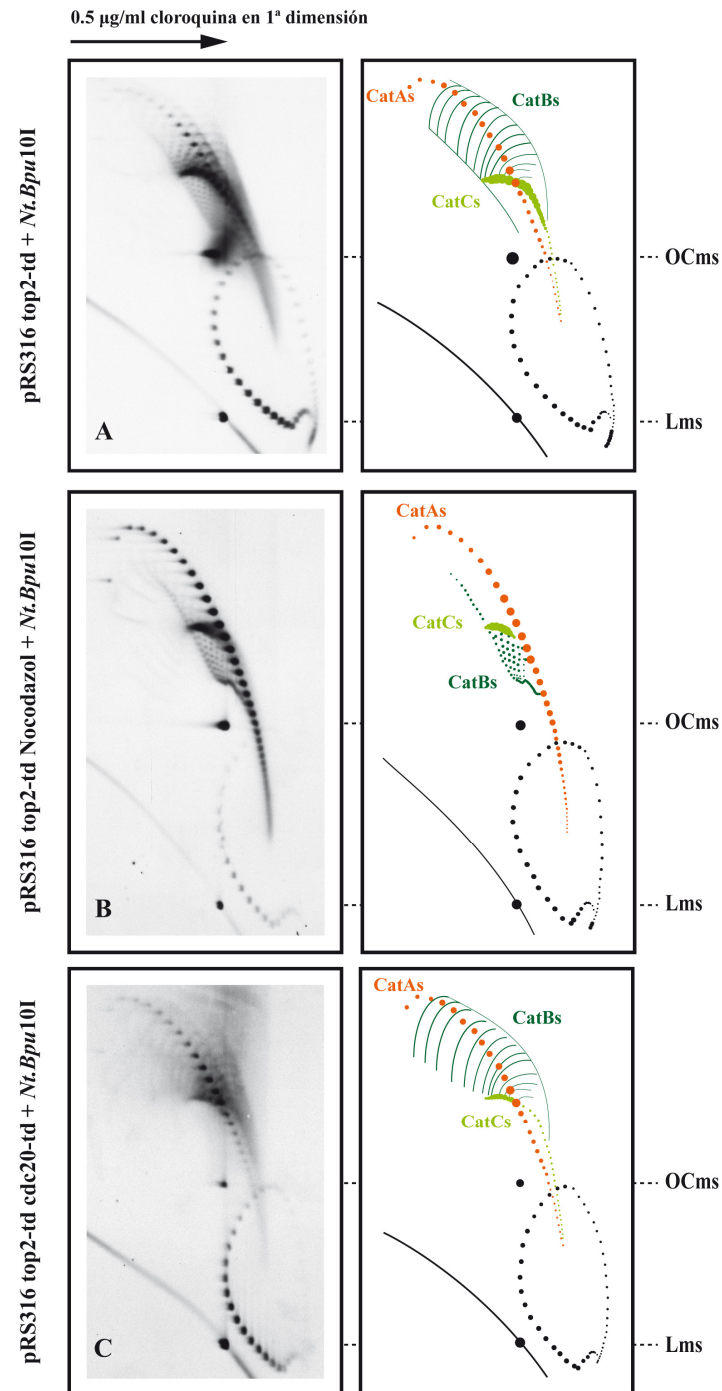


Figura 44. La transición de Cat C a Cat C* se debe a un cambio del ΔW_r , de (-) a (+), inducido por el huso mitótico. El DNA de pRS316, aislado de células top2-td crecidas en ausencia (A) o en presencia de nocodazol (B) y de células con el doble degron (C), se sometió a una digestión parcial con *Nt.Bpu10I* y se analizó mediante geles bidimensionales con 0.5 µg/ml de cloroquina en primera dimensión. El patrón de migración de los Cat B procedentes de los Cat C (en B) encaja con el de moléculas con ΔW_r (-): la cloroquina los relajó en primera dimensión. En cambio, la respuesta a la cloroquina de los Cat B resultantes de los Cat C* (en C) fue la propia de moléculas con ΔW_r (+): en primera dimensión la cloroquina les añadió más ΔW_r .

Se recogieron muestras de DNA enriquecidas en Cat C o en Cat C* 80 minutos tras la liberación de las células en el ciclo celular y se trataron con *Nt.Bpu10I* durante 15 minutos a 37°C para conseguir una digestión parcial. A continuación, se analizaron mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa empleando 0.5 µg/ml de cloroquina como agente intercalante en la primera dimensión. En la figura 44, se observa que la digestión parcial en efecto convirtió una parte de la población de Cat C y Cat C* en Cat B. Aquellos resultantes de los Cat C, de células top2-td crecidas en medio con nocodazol y por tanto sin husos mitóticos, respondieron a la cloroquina como si presentaran ΔW_r (-) (figura 44B), esto es, la cloroquina los relajó en primera dimensión. Mientras que los Cat B producto de los Cat C* en células en las que sí se formaron husos mitóticos (figura 44A y C), respondieron a la cloroquina tal y como se espera de moléculas con ΔW_r (+), es decir, las cloroquina les añadió más ΔW_r . Lo anterior permite concluir que la transición inducida por el huso mitótico se debe a un cambio en el ΔW_r , de (-) en los Cat C a (+) en los Cat C*.

4.12.8. Estudio de la topología de las formas monoméricas de pRS316 en presencia y ausencia de Top2 mediante geles bidimensionales de agarosa con cloroquina.

Debido a la ausencia de Top2 los plásmidos entran en mitosis altamente encadenados y por tanto sería posible que la adquisición de ΔW_r (+) tuviera lugar sólo bajo esas condiciones. Para descartar esa posibilidad, analizamos el ΔW_r de monómeros desencadenados por la Top2 inmediatamente después de la replicación del DNA, tanto en presencia como en ausencia de husos mitóticos. Para ello dejamos que las células replicaran su DNA en presencia de actividad Top2 (estirpe *cdc20-td*) antes de ser bloqueadas en metafase mediante el tratamiento con nocodazol. A continuación, se eliminó Cdc20-td para evitar la entrada en anafase y se lavó el nocodazol del medio permitiendo la formación del huso mitótico. Se aisló DNA tanto de células en nocodazol (sin huso) como de células tras el lavado de dicha droga (con huso mitótico), y se comparó el ΔW_r de los minicromosomas en su forma monomérica mediante geles bidimensionales de agarosa con cloroquina tanto en primera (0.5 µg/ml) como en segunda dimensión (1µg/ml) .

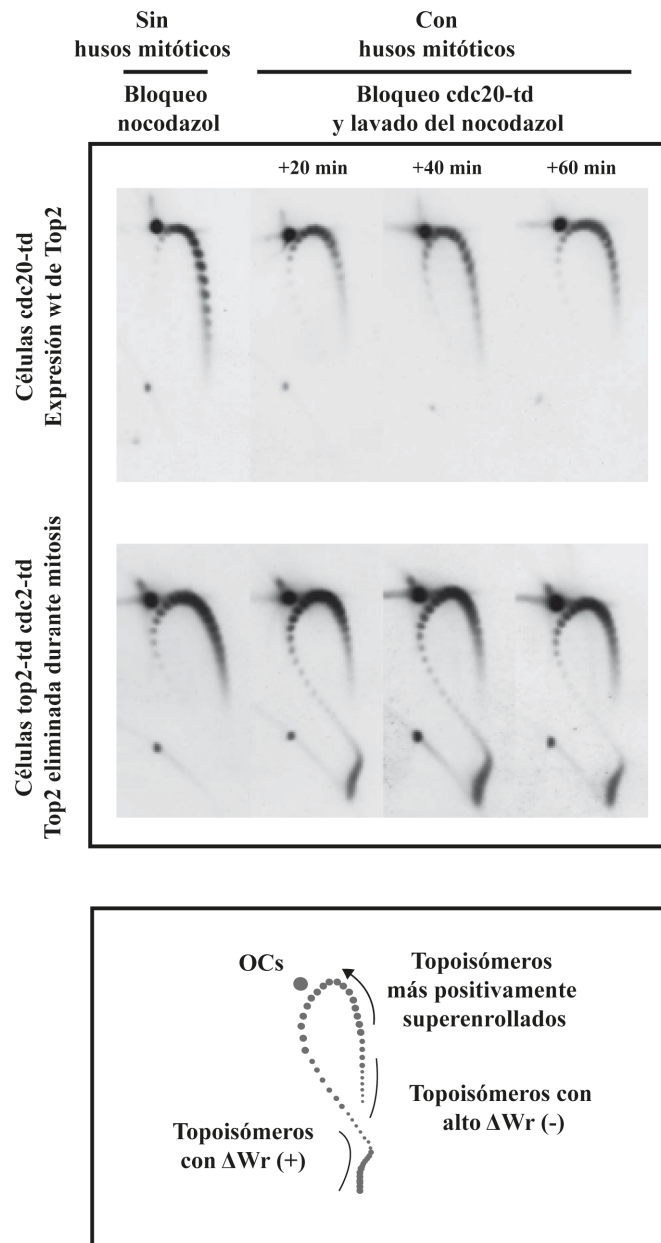


Figura 45. Los husos mitóticos inducen en los monómeros desencadenados un alto nivel de ΔW_r (+) que es rápidamente relajado en presencia de Top2. Células cdc20-td y top2-td cdc20-td se bloquearon en mitosis empleando nocodazol para impedir la formación de los husos. Las proteínas Cdc20-td o Top2-td y Cdc20-td se eliminaron cuando las células estaban aún en presencia de nocodazol. A continuación, se lavó el nocodazol del medio para permitir la formación de los husos mitóticos. DNA procedente de células en nocodazol (sin husos) y de las mismas 20, 40 y 60 minutos después del lavado (con husos mitóticos) se analizaron mediante geles bidimensionales con cloroquina para estudiar el nivel de ΔW_r de los monómeros. Arriba aparecen los resultados de las muestras con niveles endógenos de Top2, y abajo los de las muestras en donde se eliminó específicamente la Top2 durante el bloqueo en mitosis pero en las que la proteína sí estaba presente durante la interfase. El esquema bajo las autorradiografías relaciona la movilidad electroforética de los monómeros, en presencia de cloroquina, con su nivel de ΔW_r .

La formación del huso cambió la distribución del ΔWr hacia un estado más positivo (ver figura 45, arriba). No obstante, el nivel de ΔWr (+) parece menor en comparación con el observado anteriormente en los encadenados generados en ausencia de Top2 (figura 44). Teniendo en cuenta que *in vivo* las topoisomerasas son muy eficientes relajando perturbaciones topológicas en el DNA, la depleción de Top2 que empleamos para generar encadenados provocaría además una reducción en la relajación del ΔWr en la célula. Esto último podría estabilizar el ΔWr (+) inducido haciendo posible la detección del mismo en las células carentes de Top2. Para estudiarlo, repetimos el experimento pero esta vez eliminando Top2 específicamente durante el periodo en el que se forman de nuevo los husos mitóticos. Comprobamos entonces que una proporción considerable de los monómeros con ΔWr (-) observados en presencia de nocodazol pasaron a estar muy positivamente superenrollados cuando se formaron los husos mitóticos (figura 45, abajo).

De manera que durante la mitosis, tanto en los monómeros (figura 45) como en los encadenados (figura 44), se induce un fuerte ΔWr (+) que es relajado rápidamente en presencia de niveles normales de Top2 (figura 45, arriba).

4.12.9. La condensina Smc2 se requiere para la inducción del ΔWr (+).

La observación de que la formación de los husos mitóticos induce un fuerte ΔWr (+) en el DNA, hizo que nos planteásemos que tal vez el ensamblaje de los cinetocoros podría inducir de manera indirecta ese cambio topológico, a través de la activación de complejos asociados al centrómero capaces de modular la topología del DNA.

Un firme candidato es el complejo condensina SMC2/4 (Kimura et al., 1998; St-Pierre et al., 2009). Para dilucidar si el ΔWr (+) característico de los Cat C* requiere actividad Smc2, analizamos si la transición de Cat C a Cat C* tenía lugar en la estirpe smc2-8, mutante para dicha condensina (Freeman et al., 2000).

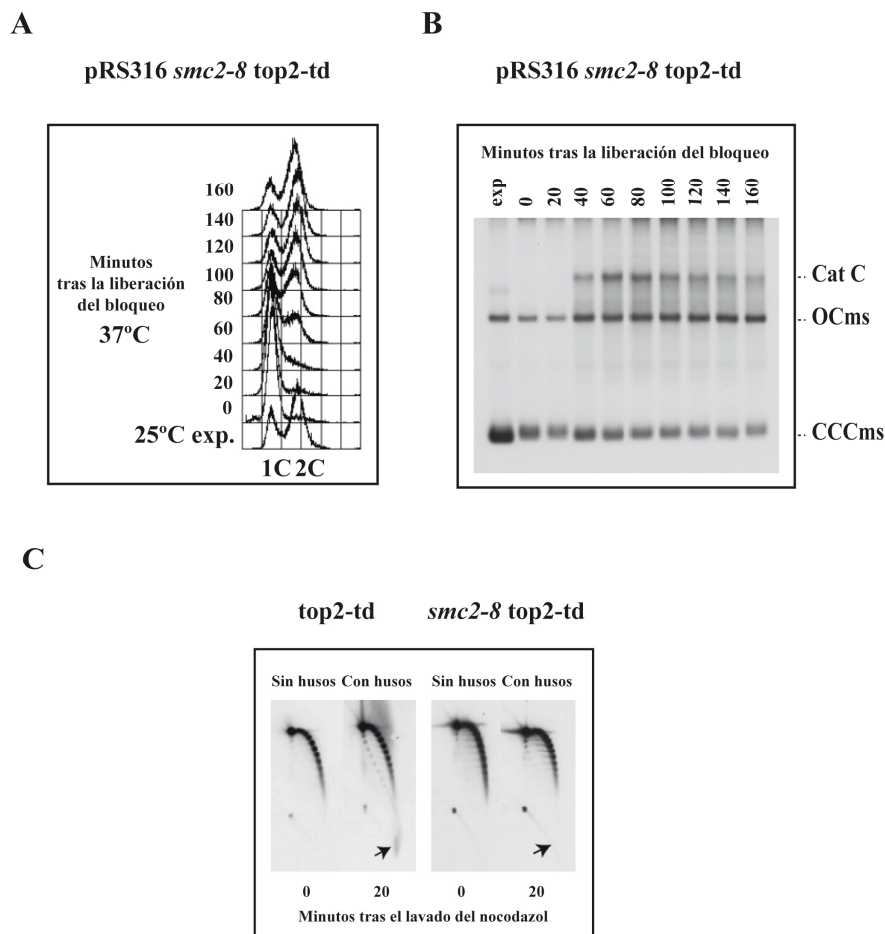


Figura 46. Para que tenga lugar la inducción ΔW_r (+) durante mitosis se requiere, además de los husos, la condensina Smc2. Células *smc2-8 top2-td* se bloquearon con α -factor con un contenido de DNA equivalente a la fase G1 y la proteína Top2-td fue degradada. A continuación, se liberaron de forma sincrónica en el ciclo celular. Se tomaron muestras en la fase de crecimiento exponencial (25°C), antes de liberarlas del bloqueo en G1 (0), y a los distintos tiempos que aparecen indicados para el análisis del contenido en DNA mediante FACS (A). Además, se estudió la topología de pRS316, en ausencia de actividad Smc2 y Top2, mediante electroforesis unidimensional en geles de agarosa al 0.8% (B). En la autorradiografía se indica la movilidad electroforética de CCCs, OCs y Cat C. En C, células *top2-td* y *smc2-8 top2-td* se bloquearon en mitosis empleando nocodazol. A continuación se degradó la proteína Top2-td y se lavó el nocodazol para permitir la formación de los husos mitóticos. Finalmente, se extrajeron las muestras de DNA y se sometieron a electroforesis bidimensional en presencia de cloroquina para analizar el nivel de ΔW_r de los monómeros. La flecha sobre las autorradiografías señala la posición de aquellos con un gran nivel ΔW_r (+). Se observa que en ausencia de Smc2 no se induce ΔW_r (+), pese a existir husos mitóticos.

Tal y como se observa en el apartado B de la figura 46, la replicación del DNA en ausencia de Smc2 y Top2 generó niveles significativos de Cat C pero no se observó su transición a Cat C*. Además, aún formándose los husos mitóticos, se requirió la presencia de Smc2 para que se generase ΔW_r (+) en los minicromosomas monoméricos (figura 46C).

5. DISCUSIÓN

5.1. Dinámica de los cambios topológicos durante la replicación de plásmidos bacterianos.

El estudio del efecto de la introducción de roturas de cadena sencilla sobre la topología de los RIs nos permitió comprobar que las consecuencias son distintas según en la región del plásmido en que se produzca dicha rotura. Así, una rotura de cadena sencilla dentro de la región ya replicada no tiene ningún efecto sobre los CCRIs. Esto se explica porque en esa región las hebras hijas están incompletas y topológicamente son irrelevantes. Algo bien distinto sucede en la porción no replicada de los RIs, en donde se puede decir que la rotura actúa a modo de sumidero, de manera que no sólo provoca la desaparición de todo el ΔW_r que esté albergado en esa región, sino que elimina además todo el pre-encadenamiento presente en la región ya replicada. Esto último se explica por el giro de las horquillas de replicación que hace posible que el pre-encadenamiento de la región ya replicada pase a la no replicada en forma de ΔW_r y sea también eliminado. Por otro lado, el pre-encadenamiento en la región replicada enmascara el anudamiento, de manera que una vez eliminado ya es posible detectar los nudos de esos RIs, tal y como se comprueba en los geles bidimensionales en donde el arco de CCRIs desaparece y es sustituido por nuevos arcos que corresponden a los RIs anudados. La presencia de esos nudos es una evidencia más a favor de la existencia de pre-encadenados *in vivo*, al menos en plásmidos bacterianos (Postow et al., 1999; Sogo et al., 1999).

5.2. Anudamiento y desanudamiento de cromátidas hermanas durante la replicación de plásmidos en *E. coli*.

Durante los últimos quince años el estudio del anudamiento y desanudamiento del DNA se ha abordado empleando, en su mayoría, moléculas de DNA relajadas (Rybenkov et al., 1997). Los experimentos en sistemas en donde la DNA girasa introduce ΔW_r en el DNA y en donde actúa también la Topo IV son más complejos que aquellos basados en DNA relajado pero proporcionan información más detallada acerca de la dinámica del anudamiento y desanudamiento *in vivo*. En este sentido, otra de las principales cuestiones

que abordamos durante esta Tesis fue la de tratar de dilucidar el origen del anudamiento de las cromátidas hermanas durante la replicación e identificar la enzima responsable del mismo.

Primeramente, se transformaron con los tres plásmidos células de la estirpe parE10 que poseen una mutación Topo IV termosensible. Se aisló el DNA de las células tras una hora a la temperatura restrictiva y se trató con las endonucleasas de restricción de cadena sencilla que actúan fuera de la región replicada de los RIs. Dado que la Topo IV se encarga de desanudar el DNA *in vivo* (Deibler et al., 2001), esperábamos observar un aumento de RIs anudados en esta estirpe, en donde la Topo IV está inhibida, en comparación con los mismos plásmidos crecidos en células DH5 α F'. Sin embargo, la proporción de RIs anudados fue prácticamente idéntica en ambas estirpes. La proporción de anudamiento también fue la misma al comparar, previa digestión con *AlwNI*, las burbujas anudadas de los tres plásmidos crecidos de nuevo en células parE10 a la temperatura permisiva (Topo IV activa) y después de una hora a la temperatura restrictiva (Topo IV inactiva). Además, al analizar la burbujas anudadas de pBR-TerE@*DraI* en células de la misma estirpe tras 60 y 120 minutos a la temperatura restrictiva, se comprobó nuevamente que el número de burbujas anudadas no cambia cuando la Topo IV está inhibida.

En 1987 y 1991 sendos trabajos de Shishido y colaboradores señalaron un aumento de los nudos formados *in vivo* en plásmidos pBR322 crecidos bien en estirpes de *E. coli* defectivas para la DNA girasa o bien en presencia de inhibidores de dicha enzima, respectivamente (Shishido et al., 1987; Ishii et al., 1991). Los autores apuntaron entonces a un posible papel de la DNA girasa en el anudamiento y desanudamiento del DNA. Sin embargo, hoy se sabe que la DNA girasa es responsable del mantenimiento del DNA en una forma superenrollada pero no es la topoisomerasa encargada de desanudar; de manera que el aumento de nudos cuando no está activa apunta a que el ΔW_r ayuda a la Topo IV a mantener el DNA desanudado *in vivo* (Burnier et al., 2008; Martínez-Robles et al., 2009; Witz and Stasiak, 2010; Witz et al., 2011).

En nuestro modelo experimental descartamos emplear la inhibición de la DNA girasa ya que afectaría a las primeras etapas de la replicación, cuando la actividad de esta enzima resulta crucial, de tal manera que la replicación no progresaría y, por tanto, los RIs no llegarían a detectarse. No obstante, los experimentos resumidos al comienzo de este apartado demuestran que esta enzima no es la responsable de hacer los nudos. Puesto que la Topo IV desanuda el DNA, su inhibición causaría un aumento de los RIs anudados si la DNA girasa fuese la responsable de su formación. Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que el nivel anudamiento no cambia cuando la Topo IV está inhibida, indicando que la DNA girasa no es la topoisomerasa que anuda el DNA.

Los experimentos mencionados anteriormente también permiten descartar que los nudos sean producto de las topoisomerasas de tipo I de *E. coli*: la Topo I o la Topo III. Como se comentó en la introducción, la Topo I puede dar lugar a moléculas anudadas a partir de moléculas circulares de cadena simple (Liu et al., 1976) y también de moléculas circulares de doble cadena cuando éstas presentan una rotura de cadena sencilla (Brown and Cozzarelli, 1981; Dean and Cozzarelli, 1985; Dean et al., 1985). Por su parte la Topo III purificada es capaz de relajar DNA negativamente superenrollado con regiones de cadena sencilla, así como de desencadenar pre-encadenados actuando en las zonas de cadena sencilla próximos a la horquilla de replicación (Dean et al., 1983; DiGate and Mariani, 1988). Además, junto con la helicasa RecQ, se ha demostrado que *in vitro* la Topo III es capaz de encadenar DNA de doble cadena intacto (Harmon et al., 1999); de manera que podría ser también la responsable de anudar el DNA. En todos los experimentos mencionados arriba la Topo IV es la única topoisomerasa que se ve afectada (por medio de una mutación termosensible en uno de sus genes), mientras que el resto permanecen activas. Según esto, si la Topo I y/o la Topo III fuesen responsables de anudar el DNA, el número de burbujas anudadas habría aumentado al inhibir la Topo IV; pero ese no ha sido el caso.

Por otro lado, se ha demostrado que el sistema de recombinación sitio-específica XerCD de *E. coli*, además de convertir dímeros en monómeros, es capaz de desencadenar monómeros encadenados tanto *in vitro* (Ip et al., 2003) como *in vivo* (Grainge et al., 2007) mediante una serie de reacciones en las que aparecen, como intermediarios, dímeros

anudados. Para comprobar si el sistema XerCD era responsable de las burbujas anudadas se transformaron con pBR-TerE@DraI células de dos estirpes mutantes para XerC y XerD, de las que se aisló el DNA que luego se digirió con *A*l_wNI y se analizó mediante electroforesis bidimensional. Las burbujas anudadas seguían estando presentes y los análisis densitométricos confirmaron que en un número muy similar al encontrado en las estirpes con el sistema XerCD intacto; indicando que estas recombinasas tampoco son responsables de la formación de nudos durante la replicación del DNA.

Como una forma más global e intuitiva de entender el significado de los resultados anteriores y sus posibles implicaciones proponemos el modelo de un tanque imaginario en cuya entrada se situaría la enzima responsable de hacer los nudos y a la salida la Topo IV, que se encarga de deshacerlos. De esta manera, en el tanque habría una cierta acumulación de RIs anudados que sería la resultante del balance entre la entrada (por parte de la enzima que anuda) y la salida de nudos en el sistema (por parte de la Topo IV, que los resuelve). Inhibir la Topo IV (por temperatura, en nuestro caso) equivaldría a taponar la salida, lo que se traduciría en un aumento de RIs anudados dentro del tanque ya que la enzima responsable de hacer los nudos seguiría introduciéndolos en el mismo. Por otro lado, si en lugar de la Topo IV inhibimos alguna de las enzimas candidatas a anudar el DNA (en nuestro caso empleando estirpes defectivas en dichas enzimas), el resultado sería una reducción o incluso la total desaparición de RIs anudados dentro del tanque, puesto que la Topo IV los resolvería activamente.

La electroforesis bidimensional y un posterior análisis densitométrico nos permitieron validar las predicciones anteriores. Sin embargo, todos los resultados descartaron una variación en el nivel de anudamiento. Volviendo sobre nuestro modelo, la única explicación es que la enzima que se sitúa a la entrada del tanque sea la misma que se encuentra a la salida, es decir, la Topo IV.

5.3. Hipótesis del anudamiento por parte de la Topo IV.

Las observaciones expuestas en el apartado anterior nos llevan a plantear la hipótesis de que la propia Topo IV, encargada de desanudar, es también la topoisomerasa responsable de crear los nudos en el DNA. En la figura 47 se representa el modelo que explica el anudamiento por parte de la Topo IV.

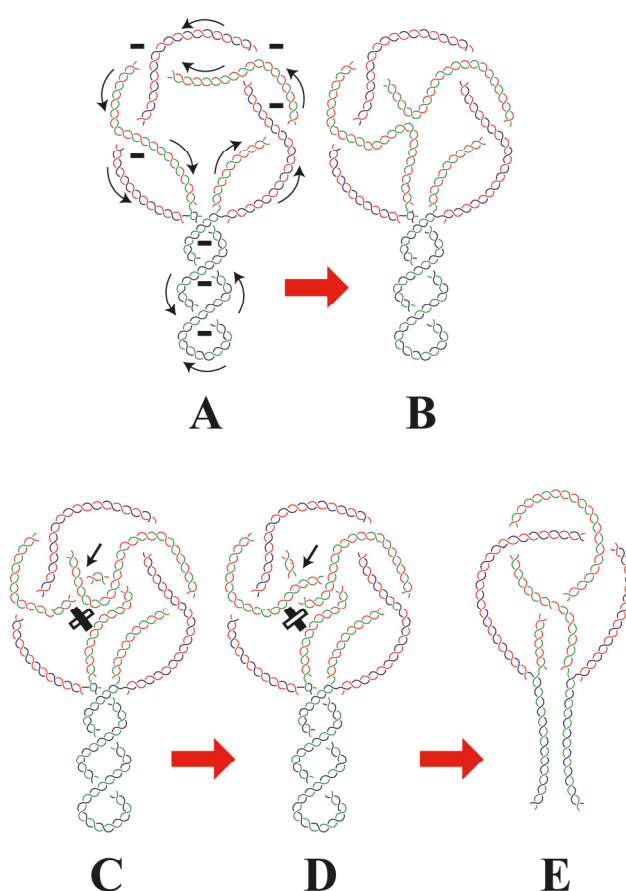


Figura 47. Los pasos de hebra aleatorios realizados por la Topo IV en regiones de cruce entre las cromátidas hermanas capturan la topología de dichos cruces formando nudos inter-cromátida. En un RI (A) la porción no replicada se encuentra negativamente superenrollada en sentido dextrógiro y todos los cruces tienen signo negativo. En la región replicada, todos los cruces tienen igualmente signo negativo, pero el pre-encadenamiento de las cromátidas hermanas es levógiro (Schvartzman and Stasiak, 2004). Bastaría con que la Topo IV actuase en una zona de cruce existente entre los pre-encadenados (B y C) para que se generase un nudo inter-cromátida de tres cruces (D). La topología de ese nudo se simplifica introduciendo un rotura de cadena sencilla en la región no replicada de la molécula, lo cual hace que desaparezcan todo el ΔW_r y el pre-encadenamiento (E). Más pases de hebra por parte de la Topo IV darían lugar a todo a toda la variedad de nudos observados *in vivo*.

Como se comentó en la introducción, en bacterias el avance de la maquinaria de replicación genera ΔW_r (+) por delante de la horquilla debido a la apertura de la doble hélice por parte de la DNA helicasa. En condiciones normales, sin ningún impedimento para el avance de la horquilla, ese exceso de ΔW_r (+) es compensado por la DNA girasa que introduce W_r (-) en la región no replicada. Además, ese ΔW_r (+) puede difundir a través de la horquilla y distribuirse también por detrás de la misma, en la región ya replicada, a modo de pre-encadenamiento (Champoux and Been, 1980) que la Topo IV se encarga de eliminar (Zechiedrich and Cozzarelli, 1995; Zechiedrich et al., 1997). En cambio, cuando la replicación está afectada, bien parando la horquilla o bien retrasando su avance, la DNA girasa es capaz de eliminar todo el ΔW_r (+) y, por tanto, no hay pre-encadenamiento en la región replicada. Nosotros proponemos que, debido a esa falta de tensión, en la región replicada se producirían yuxtaposiciones o solapamientos entre las cromátidas hermanas de tal manera que el paso de hebra catalizado por la Topo IV en una región de solapamiento atraparía dicho cruce formando un nudo entre las dos cromátidas hermanas.

Se ha demostrado que la probabilidad de anudamiento aumenta a medida que disminuye el ΔW_r (Pruss, 1985; Shishido et al., 1987), lo cual encaja con nuestro modelo según el cual los cruces entre las cromátidas hermanas, que conducirían potencialmente a la formación de nudos, se dan siempre y cuando las moléculas estén poco tensionadas.

No obstante, no se nos escapa que este modelo plantea una nueva paradoja para la Topo IV ya que el DNA es anudado por la misma enzima que se encargará de desanudarlo después, consumiendo ATP en ambos procesos. En este sentido, es importante destacar el trabajo de Neuman y colaboradores (Neuman et al., 2009), quienes proponen que, siempre que la molécula de DNA está muy tensionada, la relajación asimétrica del ΔW_r por parte de la Topo IV podría deberse a las diferencias geométricas (el diferente ángulo) que presentan los segmentos de DNA según tenga ΔW_r (-) o (+). Pero ante todo remarcan que la causa de esa asimetría se halla en las diferencias en la procesividad de la enzima. La Topo IV es altamente procesiva relajando DNA con ΔW_r (+), mientras que es distributiva relajando DNA con ΔW_r (-). Esto podría también aplicarse a nuestro modelo del anudamiento y desanudamiento por parte de la Topo IV. La enzima desanudaría los RIs de

manera procesiva siempre y cuando estuviesen muy tensionados. Sin embargo, cuando no se cumpliera esta condición (RIs con poco pre-encadenamiento), la Topo IV podría realizar de manera distributiva el cruce “erróneo” o aleatorio que da lugar a un nudo entre las cromátidas hermanas. En el conjunto total de eventos de anudamiento y desanudamiento por parte de la Topo IV triunfaría éste último debido a su procesividad.

La posibilidad de que los nudos que se forman en la región ya replicada de plásmidos con la horquilla de replicación detenida sean consecuencia directa de la falta de tensión de los pre-encadenados sugiere que cualquier fenómeno que cause un retraso del avance de la horquilla y cambie el nivel de ΔW_r de los RIs también debería afectar al anudamiento. Esa cuestión se podría abordar mediante el estudio de la transcripción de un gen en sentido contrario al de la replicación ya que causaría un retraso en la progresión de la horquilla. Por otro lado, sería interesante comprobar si el nivel de nudos en el DNA se ve afectado de la misma manera cuando se bloquea la horquilla de replicación empleando un sistema distinto al de *Ter-Tus*; como por ejemplo en una estirpe tratada con hidroxurea, un compuesto que, al inhibir la enzima ribonucleótido reductasa, priva a las células de dNTPs y bloquea el avance de la horquilla.

No obstante, no hay que perder de vista que el modelo que esbozamos está basado en observaciones realizadas en plásmidos bacterianos artificiales, de pequeño tamaño y con un bloqueo para la horquilla; de manera que es posible que los anudados sólo se formen *in vivo* si está impedida o afectada de alguna manera la progresión de la horquilla de replicación. La generalización a otros sistemas como el cromosoma de *E. coli* o los cromosomas lineales de los organismos eucariotas entraña aún una mayor dificultad.

5.4. Consecuencias del bloqueo de la horquilla de replicación.

Más allá de los evidentes problemas topológicos, el retraso o el bloqueo de la horquilla de replicación es un evento frecuente durante el ciclo celular que trae consigo otras consecuencias potencialmente dañinas para la célula (Cox et al., 2000; Michel, 2000; Rothstein et al., 2000; Sandler and Mariani, 2000). A menudo durante la replicación las

horquillas sufren retrasos, paradas temporales o incluso se bloquean pudiendo llegar al colapso, esto es, al desensamblaje de la maquinaria de replicación, cuando se encuentran con obstáculos en el DNA (Kuzminov and Stahl, 1999; Cox et al., 2000; Kowalczykowski, 2000; Marians, 2000; Sandler and Marians, 2000). Por ejemplo, pueden encontrarse una lesión en el DNA o una región de cadena sencilla, que llevan al colapso de la horquilla y a la formación de una rotura de doble cadena, respectivamente (Michel et al., 1997; Sonoda et al., 1998). También pueden encontrarse con estructuras secundarias en el DNA que constituyen un sitio de pausa de la replicación. Además, las horquillas de replicación se pueden bloquear al colisionar con la maquinaria de transcripción (McGlynn and Lloyd, 2000). Del mismo modo, agentes químicos como la hidroxurea, mencionada anteriormente, inhiben la elongación y conducen al bloqueo o el colapso de la horquilla.

Existen evidencias experimentales de que, tanto en procariotas como en eucariotas, el bloqueo de las horquillas de replicación induce recombinación (Bierne and Michel, 1994; Michel et al., 1997; Rothstein and Gangloff, 1999; Saveson and Lovett, 1999; Michel et al., 2001) que facilita que se reanude la replicación (Kogoma, 1997; Seigneur et al., 1998; Kuzminov and Stahl, 1999; Motamedi et al., 1999). En bacterias, la función primordial de la recombinación homóloga es la de reparar o rescatar horquillas de replicación rotas o detenidas (Kuzminov, 1995; Kogoma, 1996; Seigneur et al., 1998; Haber, 1999; Cox et al., 2000; McGlynn and Lloyd, 2000). Así, se sabe que las horquillas de replicación detenidas mediante complejos *Ter-Tus* estimulan la recombinación homóloga (Horiuchi et al., 1994).

En eucariotas, si bien existe una conexión similar entre replicación y recombinación homóloga, la recombinación entre secuencias con poca o ninguna homología, denominada ilegítima, parece ser más activa (Krawczak and Cooper, 1991; Sary and Sarasin, 1992) y constituye una de las principales causas de reordenamientos cromosómicos (Roth, 1988; Meuth, 1989). Tales reordenamientos son una de las fuentes de la inestabilidad genómica que caracteriza a las células tumorales.

De modo que el bloqueo de la replicación puede originar inestabilidad genómica. Por un lado, las horquillas detenidas deben ser reparadas ya que la replicación fiel y completa de los cromosomas es esencial para evitar los reordenamientos cromosómicos y la predisposición al cáncer (Weinert, 1997; Lowndes and Murguia, 2000; Myung et al., 2001). En ese sentido, la recombinación homóloga es beneficiosa para el mantenimiento de la integridad del genoma; pero si se produce en un lugar inapropiado del mismo o en un momento inadecuado del ciclo celular puede llevar a un aumento de la sensibilidad al daño en el DNA o permitir erróneamente que progrese el ciclo celular, lo cual puede elevar las tasas de mutación y de reordenamiento cromosómico (Paulovich et al., 1997; Datta et al., 2000), poniendo a las células en el camino de la transformación tumoral (Bell et al., 1999; Chakraverty and Hickson, 1999; Flores-Rozas and Kolodner, 2000). Diversos estudios en células de mamíferos han puesto de manifiesto la relación entre la frecuencia de recombinación y la inestabilidad genómica, la muerte celular y la transformación tumoral (Husain et al., 1992; Dhar et al., 1996; Donmez et al., 1996; Murthy et al., 1997).

Por otro lado, el colapso de las horquillas genera roturas, esto es, nuevos extremos libres en el DNA que promueven la recombinación ilegítima (Bierne et al., 1997) e igualmente pueden conducir a reordenamientos cromosómicos fatales para la célula (Seigneur et al., 1998; Sandler and Marians, 2000). La recombinación ilegítima podría ser una última vía para rescatar horquillas de replicación detenidas, aún a expensas de la integridad genética.

En resumen, durante la replicación la célula tiene que encontrar un balance entre evitar el colapso de las horquillas para reducir reordenamientos dañinos y promover el colapso para poder continuar la replicación. Probablemente este balance sea crítico en las células en rápido crecimiento en donde se necesita no sólo de una replicación eficiente sino también altos niveles de expresión génica.

5.5. Superenrollamiento y desencadenamiento de cromátidas hermanas en minicromosomas de *S. cerevisiae*.

Estudiando la movilidad electroforética del minicromosoma pRS316, en cultivos sincronizados de *S. cerevisiae* a lo largo del ciclo celular, observamos que durante la mitosis las moléculas encadenadas de tipo Cat C sufrían una transición topológica y denominamos a esa nueva especie Cat C*. El empleo de la electroforesis bidimensional en donde la segunda dimensión transcurrió en presencia de cloroquina evidenció la naturaleza de ese cambio: la diferencia topológica entre los dos tipos de encadenados es consecuencia de la adquisición de un fuerte ΔW_r (+) por parte de los Cat C*. Posteriormente comprobamos que la formación de los husos mitóticos junto con la condensina Smc2 son los responsables de inducir ese ΔW_r (+) en el DNA.

En procariotas se ha demostrado que el ΔW_r (-) promueve el desencadenamiento (Zechiedrich et al., 1997; Hardy et al., 2004; Martinez-Robles et al., 2009; Vologodskii, 2010). Lo anterior hace que nos preguntemos si en eucariotas el ΔW_r (+) que adquiere el DNA durante la mitosis favorece el desencadenamiento de las cromátidas hermanas por parte de la Top2. Teniendo en cuenta modelos propuestos previamente (Hirano, 2000; Hardy et al., 2004), que apuntan a que la compactación mediada por condensinas de la familia SMC podría facilitar el desencadenamiento de los cromosomas, y extrapolando nuestros datos proponemos un modelo para tratar de explicar cómo tiene lugar el desencadenamiento completo del genoma por parte de la Top2. Aunque esta topoisomerasa elimina activamente el encadenamiento entre cromátidas hermanas tras la replicación, los encadenados aún están presentes en el momento de la mitosis; de ahí que la Top2 se requiera también durante esta fase del ciclo celular (Holm et al., 1985; Uemura et al., 1987; Baxter and Diffley, 2008). Proponemos que el fuerte ΔW_r (+) inducido por el huso mitótico y la condensina Smc2 hace que los cromosomas encadenados adquieran una topología en donde los cruces intramoleculares se aíslan de los intermoleculares con una geometría que maximiza la resolución de estos últimos por parte de la Top2. Una vez que concluido el desencadenamiento de las cromátidas hermanas, la Top2 relajaría rápidamente el ΔW_r (+). De este modo la Top2 restituiría la topología del DNA hasta un estado comparable al observado antes de la transición con la importante salvedad de que ahora se

habría eliminado todo el encadenamiento, lo que resulta crucial para la correcta segregación de las cromátidas hermanas.

5.6. Consideraciones acerca de cómo el superenrollamiento promueve el desencadenamiento en procariotas y eucariotas.

Al tratar la replicación y la segregación, tanto en procariotas como en eucariotas, es importante considerar además los procesos de pérdida de cohesión entre las cromátidas hermanas, condensación y desencadenamiento que tienen lugar antes de la segregación y están estrechamente relacionados (Losada and Hirano, 2001; Losada et al., 2002). La condensación, que se supone es el resultado del ΔW_r intracromosómico, parece crucial en ambos sistemas para promover el desencadenamiento de las cromátidas por parte de las topoisomerasas de tipo II (Hirano, 1995; Koshland and Strunnikov, 1996; Hirano, 2000; Losada and Hirano, 2001). Como se comentó en el apartado anterior, en procariotas el ΔW_r (-) post-replicativo promueve el desencadenamiento (Zechiedrich et al., 1997; Martinez-Robles et al., 2009) y en la presente Tesis se muestra que durante la mitosis de eucariotas se induce ΔW_r (+). De modo que ambos tipos de ΔW_r , (-) y (+), conducirían a unos niveles de organización y compactación que promoverían el desencadenamiento y la segregación de las cromátidas hermanas; tal y como se contempla en los trabajos de Hirano y de Hardy y colaboradores (Hirano, 2000; Hardy et al., 2004).

Pero, pese a que el resultado final sea el mismo, es importante indagar por qué la compactación necesaria para impulsar el desencadenamiento viene dada por el ΔW_r (-) en procariotas y por el ΔW_r (+) en eucariotas. Se ha propuesto que en procariotas la proteína SMC (MukB en *E. coli*), junto con la DNA girasa, participaría en el mantenimiento del ΔW_r (-) ayudando así al desencadenamiento por parte de la Topo IV (Niki et al., 1991; Niki et al., 1992; Hirano and Hirano, 1998). En eucariotas el empaquetamiento del DNA en los nucleosomas hace que no exista ΔW_r sino torsión y serían las condensinas las encargadas de orquestar un empaquetamiento de orden superior en forma de ΔW_r (+) (Kimura and Hirano, 1997; Kimura et al., 1999). De manera que las proteínas SMC bacterianas y el complejo condensina eucariótico jugarían papeles análogos en la

segregación cromosómica al intervenir activamente en el plegamiento intramolecular, negativo o positivo, del DNA para hacer a las cromátidas hermanas más accesibles al desencadenamiento por parte de las topoisomerasas de tipo II correspondientes.

Una explicación complementaria, aunque no necesariamente la única, surgiría al tener en cuenta que procariotas y eucariotas utilizan diferentes estrategias para llevar a cabo la replicación, condensación y segregación el DNA. En procariotas estos procesos pueden ocurrir al mismo tiempo en la célula pero están físicamente separados en los cromosomas en donde los dominios recién replicados son rápidamente condensados y segregados espacialmente en la célula mientras aún continúa la replicación del resto del genoma. En eucariotas la separación es temporal, esto es, una vez completada la replicación del DNA tiene lugar la condensación a la que sigue, finalmente, la segregación. En resumen, en procariotas estos procesos ocurren a nivel local en diferentes dominios del cromosoma, mientras que en eucariotas tienen lugar de forma global en todo el genoma y están ordenados siguiendo una secuencia temporal. Este concepto de local frente a global encaja con trabajos recientes en donde se ha visto que en *E. coli* la condensina MukB y la Topo IV coordinan la compactación a través de una interacción física (Hayama and Mariani, 2010; Li et al., 2010). Sin embargo, en eucariotas no se ha podido demostrar hasta ahora una interacción directa entre condensinas y Top2 (Bhat et al., 1996; Hirano et al., 1997; Bhalla et al., 2002), lo cual encajaría con la hipótesis de que ambas operan globalmente en el genoma.

6. CONCLUSIONES

1. La introducción de roturas de cadena sencilla en la región no replicada de los RIs elimina tanto el ΔW_r de esa región como el pre-encadenamiento que, debido al giro de las horquillas, migra desde la región replicada.
2. El hecho de que el nivel de anudamiento permanezca constante al inhibir la Topo IV en distintas estirpes bacterianas, nos lleva a proponer que además de desanudar el DNA la Topo IV es la enzima que anuda las cromátidas hermanas durante la replicación.
3. Proponemos un modelo según el cual la Topo IV realiza pases de hebra aleatorios que atrapan cruces de pre-encadenamiento entre las dos cromátidas hermanas y conducen a la formación de nudos inter-cromátidas durante la replicación. Más tarde la misma enzima resuelve esos nudos para permitir la correcta segregación de las cromátidas hermanas.
4. Durante la mitosis en eucariotas se produce un cambio topológico en los minicromosomas encadenados *in vivo*. Dicho cambio consiste en la adquisición de ΔW_r (+) y es inducido por el huso mitótico y la condensina Smc2.
5. El ΔW_r (+) de los minicromosomas encadenados favorece su desencadenamiento por parte de la Top2.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D.E., Shekhtman, E.M., Zechiedrich, E.L., Schmid, M.B., and Cozzarelli, N.R. (1992). The Role of Topoisomerase-IV in Partitioning Bacterial Replicons and the Structure of Catenated Intermediates in DNA Replication. *Cell* 71, 277-288.
- Alexandrov, A.I., Cozzarelli, N.R., Holmes, V.F., Khodursky, A.B., Peter, B.J., Postow, L., Rybenkov, V., and Vologodskii, A.V. (1999). Mechanisms of separation of the complementary strands of DNA during replication. *Genetica* 106, 131-140.
- Aussel, L., Barre, F.X., Aroyo, M., Stasiak, A., Stasiak, A.Z., and Sherratt, D. (2002). FtsK is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* 108, 195-205.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Bach, T., Krekling, M.A., and Skarstad, K. (2003). Excess SeqA prolongs sequestration of *oriC* and delays nucleoid segregation and cell division. *EMBO J* 22, 315-323.
- Bastia, D., and Mohanty, B.K. (1996). Mechanisms for completing DNA replication. In *DNA replication in eukaryotic cells*, M.L. DePamphilis, ed. (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 177-215.
- Bates, A.D., and Maxwell, A. (1997). DNA topology: Topoisomerases keep it simple. *Curr Biol* 7, R778-R781.
- Bates, A.D., and Maxwell, A. (2005). *DNA Topology* (Oxford, Oxford University Press).
- Bauer, W.R., Crick, F.H.C., and White, J.H. (1980). Supercoiled DNA. *Sci Am* 243, 100-118.
- Bauer, W., and Vinograd, J. (1968). The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. *J Mol Biol* 33, 141- 171.
- Baxter, J., and Diffley, J.F. (2008). Topoisomerase II inactivation prevents the completion of DNA replication in budding yeast. *Mol Cell* 30, 790-802.

Bell, L., and Byers, B. (1983). Separation of branched from linear DNA by two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 130, 527-535.

Bell, D.W., Varley, J.M., Szydlo, T.E., Kang, D.H., Wahrer, D.C., Shannon, K.E., Lubratovich, M., Verselis, S.J., Isselbacher, K.J., Fraumeni, J.F., *et al.* (1999). Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 286, 2528-2531.

Berger, J.M., Gamblin, S.J., Harrison, S.C., and Wang, J.C. (1996). Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* 379, 225-232.

Bergerat, A., de Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P.C., Nicolas, A., and Forterre, P. (1997). An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* 386, 414-417.

Bhalla, N., Biggins, S., and Murray, A.W. (2002). Mutation of YCS4, a budding yeast condensin subunit, affects mitotic and nonmitotic chromosome behavior. *Mol Biol Cell* 13, 632-645.

Bhat, M.A., Philp, A.V., Glover, D.M., and Bellen, H.J. (1996). Chromatid segregation at anaphase requires the barren product, a novel chromosome-associated protein that interacts with Topoisomerase II. *Cell* 87, 1103-1114.

Bierne, H., Ehrlich, S.D., and Michel, B. (1997). Deletions at stalled replication forks occur by two different pathways. *EMBO J* 16, 3332-3340.

Bierne, H., and Michel, B. (1994). When replication forks stop. *Mol Microbiol* 13, 17-23.

Bigot, S., Corre, J., Louarn, J.M., Cornet, F., and Barre, F.X. (2004). FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein. *Mol Microbiol* 54, 876-886.

Binnig, G., Quate, C.F., and Gerber, C. (1986). Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 56, 930-933.

- Boles, T.C., White, J.H., and Cozzarelli, N.R. (1990). Structure of plectonemically supercoiled DNA. *J Mol Biol* 213, 931-951.
- Bolívar, F., Rodríguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., and Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles, II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95-113.
- Breeden, L.L. (1997). Alpha-factor synchronization of budding yeast. *Methods Enzymol* 283, 332-341.
- Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (1987). The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell* 51, 463-471.
- Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (1988). A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes. *Cell* 55, 637-643.
- Brewer, B.J., Sena, E.P., and Fangman, W.L. (1988). Analysis of replication intermediates by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Cancer Cells* 6, 229-234.
- Briggs, G.S., Mahdi, A.A., Wen, Q., and Lloyd, R.G. (2005). DNA binding by the substrate specificity (wedge) domain of RecG helicase suggests a role in processivity. *J Biol Chem* 280, 13921-13927.
- Brown, P.O., and Cozzarelli, N.R. (1979). A sign inversion mechanism for enzymatic supercoiling of DNA. *Science* 206, 1081-1083.
- Brown, P.O., and Cozzarelli, N.R. (1981). Catenation and knotting of duplex DNA by type 1 topoisomerases: a mechanistic parallel with type 2 topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 843-847.
- Buck, G.R., and Zechiedrich, E.L. (2004). DNA disentangling by type-2 topoisomerases. *J Mol Biol* 340, 933-939.
- Burnier, Y., Dorier, J., and Stasiak, A. (2008). DNA supercoiling inhibits DNA knotting. *Nucleic Acids Res* 36, 4956-4963.

Cairns, J. (1963). The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography. *J Mol Biol* 6, 208-213.

Chakraverty, R.K., and Hickson, I.D. (1999). Defending genome integrity during DNA replication: a proposed role for RecQ family helicases. *BioEssays* 21, 286-294.

Champoux, J.J. (2001). DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 70, 369-413.

Champoux, J.J., and Been, M.D. (1980). Topoisomerases and the swivel problem. In *Mechanistic studies of DNA replication and genetic recombination*, B. Alberts, ed. (New York, Academic Press), pp. 809-815.

Charvin, G., Bensimon, D., and Croquette, V. (2003). Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 9820-9825.

Clayton, D.A., and Vinograd, J. (1967). Circular dimer and catenate forms of mitochondrial DNA in human leukaemic leucocytes. *Nature* 216, 652-657.

Colloms, S.D., Bath, J., and Sherratt, D.J. (1997). Topological selectivity in Xer site-specific recombination. *Cell* 88, 855-864.

Cornet, F., Hallet, B., and Sherratt, D.J. (1997). Xer recombination in *Escherichia coli*. Site-specific DNA topoisomerase activity of the XerC and XerD recombinases. *J Biol Chem* 272, 21927-21931.

Cox, M.M., Goodman, M.F., Kreuzer, K.N., Sherratt, D.J., Sandler, S.J., and Mariani, K.J. (2000). The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* 404, 37-41.

Cozzarelli, N.R. (1980). DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* 207, 953-960.

Crisona, N.J., Strick, T.R., Bensimon, D., Croquette, V., and Cozzarelli, N.R. (2000). Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *E. coli* topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. *Genes & Dev* 14, 2881-2892.

- Datta, A., Schmeits, J.L., Amin, N.S., Lau, P.J., Myung, K., and Kolodner, R.D. (2000). Checkpoint-dependent activation of mutagenic repair in *Saccharomyces cerevisiae* pol3-01 mutants. *Mol Cell* 6, 593-603.
- Dean, F., Krasnow, M.A., Otter, R., Matzuk, M.M., Spengler, S.J., and Cozzarelli, N.R. (1983). *Escherichia coli* type-1 topoisomerases: identification, mechanism, and role in recombination. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 47 Pt 2, 769-777.
- Dean, F.B., and Cozzarelli, N.R. (1985). Mechanism of strand passage by *Escherichia coli* topoisomerase I. The role of the required nick in catenation and knotting of duplex DNA. *J Biol Chem* 260, 4984-4994.
- Dean, F.B., Stasiak, A., Koller, T., and Cozzarelli, N.R. (1985). Duplex DNA knots produced by *Escherichia coli* topoisomerase I. *J Biol Chem* 260, 4975-4983.
- Deibler, R.W., Mann, J.K., Sumners de, W.L., and Zechiedrich, L. (2007). Hin-mediated DNA knotting and recombining promote replicon dysfunction and mutation. *BMC Mol Biol* 8, 44.
- Deibler, R.W., Rahmati, S., and Zechiedrich, E.L. (2001). Topoisomerase IV, alone, unknots DNA in *E-coli*. *Genes & Dev* 15, 748-761.
- Dewitt, S.K., and Adelberg, E.A. (1962). The Occurrence of a Genetic Transposition in a Strain of *Escherichia Coli*. *Genetics* 47, 577-585.
- Dhar, P.K., Devi, S., Rao, T.R., Kumari, U., Joseph, A., Kumar, M.R., Nayak, S., Shreemati, Y., Bhat, S.M., and Bhat, K.R. (1996). Significance of lymphocytic sister chromatid exchange frequencies in ovarian cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet* 89, 105-108.
- Di Capua, E., Engel, A., Stasiak, A., and Koller, T. (1982). Characterization of complexes between recA protein and duplex DNA by electron microscopy. *J Mol Biol* 157, 87-103.
- DiGate, R.J., and Marians, K.J. (1988). Identification of a potent decatenating enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 263, 13366-13373.

DiNardo, S., Voelkel, K., and Sternglanz, R. (1984). DNA topoisomerase II mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* *81*, 2616-2620.

Dohmen, R.J., Wu, P., and Varshavsky, A. (1994). Heat-inducible degron: a method for constructing temperature-sensitive mutants. *Science* *263*, 1273-1276.

Donmez, H., Ozkul, Y., and Ucak, R. (1996). Sister chromatid exchange frequency in inhabitants exposed to asbestos in Turkey. *Mutat Res* *361*, 129-132.

Englund, P.T., Hajduk, S.L., and Marini, J.C. (1982). The molecular biology of trypanosomes. *Annu Rev Biochem* *51*, 695-726.

Flores-Rozas, H., and Kolodner, R.D. (2000). Links between replication, recombination and genome instability in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* *25*, 196-200.

Forterre, P., Gribaldo, S., Gadelle, D., and Serre, M.C. (2007). Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie* *89*, 427-446.

Freeman, L., Aragon-Alcaide, L., and Strunnikov, A. (2000). The condensin complex governs chromosome condensation and mitotic transmission of rDNA. *J Cell Biol* *149*, 811-824.

Friedman, K.L., and Brewer, B.J. (1995). Analysis of replication intermediates by two-dimensional agarose gel electrophoresis. In *DNA Replication*, J.L. Campbell, ed. (525 B Street, Suite 1900, San Diego, CA 92101-4495, Academic Press Inc.), pp. 613-627.

Froelichammon, S.J., and Osheroff, N. (1995). Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J Biol Chem* *270*, 21429-21432.

Funnell, B.E., Baker, T.A., and Kornberg, A. (1987). In vitro assembly of a prepriming complex at the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J Biol Chem* *262*, 10327-10334.

- Gahn, T.A., and Schildkraut, C.L. (1989). The Epstein-Barr virus origin of plasmid replication, oriP, contains both the initiation and termination sites of DNA replication. *Cell* 58, 527-535.
- Gellert, M. (1981). DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 50, 879-910.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., and Nash, H.A. (1976). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 73, 3872-3876.
- Giaever, G., Snyder, L., and Wang, J.C. (1988). DNA supercoiling in vivo. *Biophys Chemistry* 29, 7-15.
- Giaever, G.N., and Wang, J.C. (1988). Supercoiling of intracellular DNA can occur in eukaryotic cells. *Cell* 55, 849-856.
- Goto, T., and Wang, J.C. (1985). Cloning of yeast TOP1, the gene encoding DNA topoisomerase I, and construction of mutants defective in both DNA topoisomerase I and DNA topoisomerase II. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 7178-7182.
- Grainge, I., Bregu, M., Vazquez, M., Sivanathan, V., Ip, S.C., and Sherratt, D.J. (2007). Unlinking chromosome catenanes in vivo by site-specific recombination. *EMBO J* 26, 4228-4238.
- Gregg, A.V., McGlynn, P., Jaktaji, R.P., and Lloyd, R.G. (2002). Direct rescue of stalled DNA replication forks via the combined action of PriA and RecG helicase activities. *Mol Cell* 9, 241-251.
- Griffith, J.D., and Nash, H.A. (1985). Genetic rearrangement of DNA induces knots with a unique topology: Implications for the mechanism of synapsis and crossing-over. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 3124-3128.
- Guyer, M.S., Reed, R.R., Steitz, J.A., and Low, K.B. (1981). Identification of a sex-factor-affinity site in *E. coli* as gamma delta. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 45 Pt 1, 135-140.

- Haber, J.E. (1999). DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci* 24, 271-275.
- Hanahan, D. (1986). Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA cloning, a practical approach*, G. D.M., ed. (Oxford, IRL Press), pp. 109-135.
- Hanai, R., and Roca, J. (1999). Two-dimensional agarose-gel electrophoresis of DNA topoisomers. In *Dna Topoisomerase Protocols*, M.A. Bjornsti, and N. Osheroff, eds. (1999 Riverview Dr, Ste 208, Totowa, NJ 07512-1165, USA, Humana Press Inc), pp. 19-27.
- Hardy, C.D., Crisona, N.J., Stone, M.D., and Cozzarelli, N.R. (2004). Disentangling DNA during replication: a tale of two strands. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 359, 39-47.
- Harmon, F.G., DiGate, R.J., and Kowalczykowski, S.C. (1999). RecQ helicase and topoisomerase III comprise a novel DNA strand passage function: A conserved mechanism for control of DNA recombination. *Mol Cell* 3, 611-620.
- Hayama, R., and Mariani, K.J. (2010). Physical and functional interaction between the condensin MukB and the decatenase topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 18826-18831.
- Hernández, P., Martín-Parras, L., Martínez-Robles, M.L., and Schwartzman, J.B. (1993). Conserved features in the mode of replication of eukaryotic ribosomal RNA genes. *EMBO J* 12, 1475-1485.
- Hiasa, H., DiGate, R.J., and Mariani, K.J. (1994). Decatenating activity of *Escherichia coli* DNA gyrase and topoisomerases I and III during *oriC* and pBR322 DNA replication in vitro. *J Biol Chem* 269, 2093-2099.
- Hiasa, H., and Mariani, K.J. (1996). Two distinct modes of strand unlinking during theta-type DNA replication. *J Biol Chem* 271, 21529-21535.
- Hill, T.M. (1992). Arrest of Bacterial DNA Replication. *Annu Rev Microbiol* 46, 603-633.

- Hirano, T. (1995). Biochemical and genetic dissection of mitotic chromosome condensation. *Trends Biochem Sci* 20, 357-361.
- Hirano, T. (2000). Chromosome cohesion, condensation, and separation. *Annu Rev Biochem* 69, 115-144.
- Hirano, M., and Hirano, T. (1998). ATP-dependent aggregation of single-stranded DNA by a bacterial SMC homodimer. *EMBO J* 17, 7139-7148.
- Hirano, T., Kobayashi, R., and Hirano, M. (1997). Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a Xenopus homolog of the Drosophila Barren protein. *Cell* 89, 511-521.
- Hirota, Y., Ryter, A., and Jacob, F. (1968). Thermosensitive mutants of E. coli affected in the processes of DNA synthesis and cellular division. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 33, 677-693.
- Holm, C., Goto, T., Wang, J.C., and Botstein, D. (1985). DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. *Cell* 41, 553-563.
- Horiuchi, T., Fujimura, Y., Nishitani, H., Kobayashi, T., and Hidaka, M. (1994). DNA replication fork blocked at the ter site may be an entrance for the RecBCD enzyme into duplex DNA. *J Bacteriol* 176, 4656-4663.
- Hsieh, T. (1983). Knotting of the circular duplex DNA by type II DNA topoisomerase from *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 258, 8413-8420.
- Huang, W.M. (1994). Type II DNA topoisomerase genes. *Adv Pharmacol* 294, 201-225.
- Huang, W.M. (1996). Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes. *Annu Rev Genet* 30, 79-107.
- Huberman, J.A. (1987). Eukaryotic DNA replication, a complex picture partially clarified. *Cell* 48, 7-8.

- Hudson, B., and Vinograd, J. (1967). Catenated circular DNA molecules in HeLa cell mitochondria. *Nature* 216, 647-652.
- Husain, S.A., Balasubramanian, S., and Bamezai, R. (1992). Sister chromatid exchange frequency in breast cancer cases. *Cancer Genet Cytogenet* 61, 142-146.
- Ip, S.C.Y., Bregu, M., Barre, F.X., and Sherratt, D.J. (2003). Decatenation of DNA circles by FtsK-dependent Xer site-specific recombination. *EMBO J* 22, 6399-6407.
- Ishii, S., Murakami, T., and Shishido, K. (1991). Gyrase inhibitors increase the content of knotted DNA species of plasmid pBR322 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173, 5551-5553.
- Jaenisch, R., and Levine, A.J. (1973). DNA replication of SV40-infected cells. VII. Formation of SV40 catenated and circular dimers. *J Mol Biol* 73, 199-212.
- Kanaar, R., and Cozzarelli, N.R. (1992). Roles of supercoiled DNA structure in DNA transactions. *Curr Opin Struct Biol* 2, 369-379.
- Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S., and Suzuki, H. (1990). New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* 63, 393-404.
- Kato, J., Nishimura, Y., Yamada, M., Suzuki, H., and Hirota, Y. (1988). Gene organization in the region containing a new gene involved in chromosome partition in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170, 3967-3977.
- Khodursky, A.B., Peter, B.J., Schmidt, M.B., DeRisi, J., Botstein, D., Brown, P.O., and Cozzarelli, N.R. (2000). Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: Use of DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 9419-9424.
- Kim, R.A., and Wang, J.C. (1989). Function of DNA topoisomerases as replication swivels in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 208, 257-267.
- Kim, R.A., and Wang, J.C. (1992). Identification of the yeast TOP3 gene product as a single strand-specific DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 267, 17178-17185.

Kimura, K., and Hirano, T. (1997). ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation. *Cell* 90, 625-634.

Kimura, K., Hirano, M., Kobayashi, R., and Hirano, T. (1998). Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. *Science* 282, 487-490.

Kimura, K., Rybenkov, V.V., Crisona, N.J., Hirano, T., and Cozzarelli, N.R. (1999). 13S condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: Implications for chromosome condensation. *Cell* 98, 239-248.

Klevan, L., and Wang, J.C. (1980). Deoxyribonucleic acid gyrase-deoxyribonucleic acid complex containing 140 base pairs of deoxyribonucleic acid and an alpha 2 beta 2 protein core. *Biochemistry* 19, 5229-5234.

Kogoma, T. (1996). Recombination by replication. *Cell* 85, 625-627.

Kogoma, T. (1997). Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 212-238.

Kornberg, A., and Baker, T.A. (1992). DNA Replication, 2nd. edn (New York, W.H. Freeman and Co.).

Kornberg, R.D., and Lorch, Y. (1992). Chromatin structure and transcription. *Annu Rev Cell Biol* 8, 563-687.

Koshland, D., and Strunnikov, A. (1996). Mitotic chromosome condensation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 305-333.

Kowalczykowski, S.C. (2000). Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem Sci* 25, 156-165.

Krasnow, M.A., Stasiak, A., Spengler, S.J., Dean, F., Koller, T., and Cozzarelli, N.R. (1983). Determination of the absolute handedness of knots and catenanes of DNA. *Nature* 304, 559-560.

Krawczak, M., and Cooper, D.N. (1991). Gene deletions causing human genetic disease: mechanisms of mutagenesis and the role of the local DNA sequence environment. *Hum Genet* 86, 425-441.

Kreuzer, K.N., and Cozzarelli, N.R. (1980). Formation and resolution of DNA catenanes by DNA gyrase. *Cell* 20, 245-254.

Kupersztoch, Y.M., and Helinski, D.R. (1973). A catenated DNA molecule as an intermediate in the replication of the resistance transfer factor R6K in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 54, 1451-1459.

Kuzminov, A. (1995). Collapse and repair of replication forks in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 16, 373-384.

Kuzminov, A., and Stahl, F.W. (1999). Double-strand end repair via the RecBC pathway in *Escherichia coli* primes DNA replication. *Genes & Dev* 13, 345-356.

Labib, K., Diffley, J.F.X., and Kearsey, S.E. (1999). G1-phase and B-type cyclins exclude the DNA-replication factor Mcm4 from the nucleus. *Nat Cell Biol* 1, 415-422.

Levine, C., Hiasa, H., and Marians, K.J. (1998). DNA gyrase and topoisomerase IV: Biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *BBA Gene Struct Express* 1400, 29-43.

Lewin, B. (2000). *Genes VII* (Oxford, Oxford University Press).

Li, Y., Stewart, N.K., Berger, A.J., Vos, S., Schoeffler, A.J., Berger, J.M., Chait, B.T., and Oakley, M.G. (2010). *Escherichia coli* condensin MukB stimulates topoisomerase IV activity by a direct physical interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 18832-18837.

Linskens, M.H.K., and Huberman, J.A. (1988). Organization of replication of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 8, 4927-4935.

Little, R.D., Platt, T.H.K., and Schildkraut, C.L. (1993). Initiation and termination of DNA replication in human rRNA genes. *Mol Cell Biol* 13, 6600-6613.

- Liu, L.F., Davis, J.L., and Calendar, R. (1981a). Novel topologically knotted DNA from bacteriophage P4 capsids: studies with DNA topoisomerases. *Nucleic Acids Res* 9, 3979-3989.
- Liu, L.F., Depew, R.E., and Wang, J.C. (1976). Knotted single-stranded DNA rings: a novel topological isomer of circular single-stranded DNA formed by treatment with *Escherichia coli* omega protein. *J Mol Biol* 106, 439-452.
- Liu, L.F., Liu, C.C., and Alberts, B.M. (1980). Type II DNA topoisomerases enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double-strand break. *Cell* 19, 697-707.
- Liu, L.F., Perkocha, L., Calendar, R., and Wang, J.C. (1981b). Knotted DNA from bacteriophage capsids. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 5498-5502.
- Liu, L.F., and Wang, J.C. (1987). Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 7024-7027.
- López-Estraño, C., Schwartzman, J.B., Krimer, D.B., and Hernández, P. (1998). Co-localization of polar replication fork barriers and rRNA transcription terminators in mouse rDNA. *J Mol Biol* 277, 249-256.
- Losada, A., and Hirano, T. (2001). Shaping the metaphase chromosome: coordination of cohesion and condensation. *BioEssays* 23, 924-935.
- Losada, A., Hirano, M., and Hirano, T. (2002). Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis. *Genes & Dev* 16, 3004-3016.
- Lowndes, N.F., and Murguia, J.R. (2000). Sensing and responding to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* 10, 17-25.
- Lucas, I., Germe, T., Chevrier-Miller, M., and Hyrien, O. (2001). Topoisomerase II can unlink replicating DNA by precatenane removal. *EMBO J* 20, 6509-6519.

Lucchini, R., Wellinger, R.E., and Sogo, J.M. (2001). Nucleosome positioning at the replication fork. *EMBO J* 20, 7294-7302.

Lusetti, S.L., and Cox, M.M. (2002). The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. *Annu Rev Biochem* 71, 71-100.

Lyubchenko, Y.L., and Shlyakhtenko, L.S. (1997). Visualization of supercoiled DNA with atomic force microscopy in situ. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 496-501.

Marians, K.J. (1992). Prokaryotic DNA replication. *Annu Rev Biochem* 61, 673-719.

Marians, K.J. (2000). PriA-directed replication fork restart in *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci* 25, 185-189.

Marians, K.J., Minden, J.S., and Parada, C. (1986). Replication of superhelical DNAs in vitro. *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol* 33, 111-140.

Marsden, M.P.F., and Laemmli, U.K. (1979). Metaphase chromosome structure evidence for a radial loop model. *Cell* 17, 849-858.

Martín-Parras, L., Hernández, P., Martínez-Robles, M.L., and Schwartzman, J.B. (1991). Unidirectional replication as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *J Mol Biol* 220, 843-853.

Martín-Parras, L., Hernández, P., Martínez-Robles, M.L., and Schwartzman, J.B. (1992). Initiation of DNA replication in ColE1 plasmids containing multiple potential origins of replication. *J Biol Chem* 267, 22496-22505.

Martin-Parras, L., Lucas, I., Martinez-Robles, M.L., Hernandez, P., Krimer, D.B., Hyrien, O., and Schwartzman, J.B. (1998). Topological complexity of different populations of pBR322 as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 26, 3424-3432.

Martinez-Robles, M.L., Witz, G., Hernandez, P., Schwartzman, J.B., Stasiak, A., and Krimer, D.B. (2009). Interplay of DNA supercoiling and catenation during the segregation of sister duplexes. *Nucleic Acids Res* 37, 5126-5137.

- McGlynn, P., and Lloyd, R.G. (2000). Modulation of RNA polymerase by (P)ppGpp reveals a RecG-dependent mechanism for replication fork progression. *Cell* 101, 35-45.
- Meuth, M. (1989). Illegitimate recombination in mammalian cells. In *Mobile DNA*, D.E.a.H. Berg, M. M., ed. (Washington, DC, American Society for Microbiology), pp. 833-860.
- Michel, B. (2000). Replication fork arrest and DNA recombination. *Trends Biochem Sci* 25, 173-178.
- Michel, B., Ehrlich, S.D., and Uzest, M. (1997). DNA double-strand breaks caused by replication arrest. *EMBO J* 16, 430-438.
- Michel, B., Flores, M.J., Viguera, E., Grompone, G., Seigneur, M., and Bidnenko, V. (2001). Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 8181-8188.
- Mirambeau, G., Duquet, M., and Forterre, P. (1984). ATP-dependent DNA topoisomerase from the archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. Relaxation of supercoiled DNA at high temperature. *J Mol Biol* 179, 559-563.
- Mizuuchi, K., Fisher, L.M., O'Dea, M.H., and Gellert, M. (1980). DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 1847-1851.
- Motamedi, M.R., Szigety, S.K., and Rosenberg, S.M. (1999). Double-strand-break repair recombination in *Escherichia coli*: physical evidence for a DNA replication mechanism in vivo. *Genes & Dev* 13, 2889-2903.
- Murthy, M.K., Bhargava, M.K., and Augustus, M. (1997). Sister chromatid exchange studies in oral cancer patients. *Indian J Cancer* 34, 49-58.
- Myung, K., Datta, A., and Kolodner, R.D. (2001). Suppression of spontaneous chromosomal rearrangements by S phase checkpoint functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104, 397-408.

Neuman, K.C., Charvin, G., Bensimon, D., and Croquette, V. (2009). Mechanisms of chiral discrimination by topoisomerase IV. *Proc Natl Acad Sci USA* *106*, 6986-6991.

Nichols, M.D., DeAngelis, K., Keck, J.L., and Berger, J.M. (1999). Structure and function of an archaeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11. *EMBO J* *18*, 6177-6188.

Niki, H., Imamura, R., Kitaoka, M., Yamanaka, K., Ogura, T., and Hiraga, S. (1992). E.coli MukB protein involved in chromosome partition forms a homodimer with a rod-and-hinge structure having DNA binding and ATP/GTP binding activities. *EMBO J* *11*, 5101-5109.

Niki, H., Jaffe, A., Imamura, R., Ogura, T., and Hiraga, S. (1991). The New Gene mukB Codes for a 177 kd Protein with Coiled-Coil Domains Involved in Chromosome Partitioning of E-Coli. *EMBO J* *10*, 183-193.

Nitiss, J.L. (1998). Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta Gene Struct Express* *1400*, 63-81.

Novick, R.P., Smith, K., Sheehy, R.J., and Murphy, E. (1973). A catenated intermediate in plasmid replication. *Biochem Biophys Res Commun* *54*, 1460-1469.

Olavarrieta, L., Hernández, P., Krimer, D.B., and Schwartzman, J.B. (2002a). DNA knotting caused by head-on collision of transcription and replication. *J Mol Biol* *322*, 1-6.

Olavarrieta, L., Martínez-Robles, M.L., Hernández, P., Krimer, D.B., and Schwartzman, J.B. (2002b). Knotting dynamics during DNA replication. *Mol Microbiol* *46*, 699-707.

Olavarrieta, L., Martinez-Robles, M.L., Sogo, J.M., Stasiak, A., Hernandez, P., Krimer, D.B., and Schwartzman, J.B. (2002c). Supercoiling, knotting and replication fork reversal in partially replicated plasmids. *Nucleic Acids Res* *30*, 656-666.

Oliveira, R.A., Hamilton, R.S., Pauli, A., Davis, I., and Nasmyth, K. (2010). Cohesin cleavage and Cdk inhibition trigger formation of daughter nuclei. *Nat Cell Biol* *12*, 185-192.

Paulovich, A.G., Toczyski, D.P., and Hartwell, L.H. (1997). When checkpoints fail. *Cell* 88, 315-321.

Peng, H., and Mariani, K.J. (1993). Decatenation activity of Topoisomerase-IV during *oriC* and pBR322 DNA replication invitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8571-8575.

Peter, B.J., Ullsperger, C., Hiasa, H., Mariani, K.J., and Cozzarelli, N.R. (1998). The structure of supercoiled intermediates in DNA replication. *Cell* 94, 819-827.

Portugal, J., and Rodriguez-Campos, A. (1996). T7 RNA polymerase cannot transcribe through a highly knotted DNA template. *Nucleic Acids Res* 24, 4890-4894.

Postow, L., Peter, B.J., and Cozzarelli, N.B. (1999). Knot what we thought before: the twisted story of replication. *Bioessays* 21, 805-808.

Postow, L., Ullsperger, C., Keller, R.W., Bustamante, C., Vologodskii, A.V., and Cozzarelli, N.R. (2001). Positive torsional strain causes the formation of a four-way junction at replication forks. *J Biol Chem* 276, 2790-2796.

Pruss, G.J. (1985). DNA topoisomerase I mutants: Increased heterogeneity in linking number and other replicon-dependent changes in DNA supercoiling. *J Mol Biol* 185, 51-63.

Roca, J., Berger, J.M., Harrison, S.C., and Wang, J.C. (1996). DNA transport by a type II topoisomerase: direct evidence for a two-gate mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 4057-4062.

Roca, A.I., and Cox, M.M. (1997). RecA protein: structure, function, and role in recombinational DNA repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 56, 129-223.

Roca, J., and Wang, J.C. (1992). The capture of a DNA double helix by an ATP-dependent protein clamp: a key step in DNA transport by type II DNA topoisomerases. *Cell* 71, 833-840.

Roca, J., and Wang, J.C. (1994). DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favor of a two-gate mechanism. *Cell* 77, 609-616.

Roth, D.a.W., J. (1988). Illegitimate recombination in mammalian cells. In *Genetic Recombination*, R.a.S. Kucherlapati, G. R., ed. (Washington, DC, American Society for Microbiology), pp. 621-653.

Rothstein, R., and Gangloff, S. (1999). The shuffling of a mortal coil. *Nat Genet* 22, 4-6.

Rothstein, R., Michel, B., and Gangloff, S. (2000). Replication fork pausing and recombination or "gimme a break". *Genes & Dev* 14, 1-10.

Rybenkov, V.V., Ullsperger, C., Vologodskii, A.V., and Cozzarelli, N.R. (1997). Simplification of DNA topology below equilibrium values by type II topoisomerases. *Science* 277, 690-693.

Sakakibara, Y., Suzuki, K., and Tomizawa, J.I. (1976). Formation of catenated molecules by replication of colicin E1 plasmid DNA in cell extracts. *J Mol Biol* 108, 569-582.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sancar, A., Stachelek, C., Konigsberg, W., and Rupp, W.D. (1980). Sequences of the *recA* gene and protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 2611-2615.

Sandler, S.J., and Marians, K.J. (2000). Role of PriA in replication fork reactivation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182, 9-13.

Santamaría, D., de la Cueva, G., Martínez-Robles, M.L., Krimer, D.B., Hernández, P., and Schwartzman, J.B. (1998). DnaB helicase is unable to dissociate RNA-DNA hybrids - Its implication in the polar pausing of replication forks at *ColE1* origins. *J Biol Chem* 273, 33386-33396.

Santamaría, D., Hernández, P., Martínez-Robles, M.L., Krimer, D.B., and Schwartzman, J.B. (2000a). Premature termination of DNA replication in plasmids carrying two inversely oriented *ColE1* origins. *J Mol Biol* 300, 75-82.

- Santamaría, D., Viguera, E., Martínez-Robles, M.L., Hyrien, O., Hernandez, P., Krimer, D.B., and Schvartzman, J.B. (2000b). Bi-directional replication and random termination. *Nucleic Acids Res* 28, 2099-2107.
- Sattin, B.D., and Goh, M.C. (2004). Direct observation of the assembly of RecA/DNA complexes by atomic force microscopy. *Biophys J* 87, 3430-3436.
- Saveson, C.J., and Lovett, S.T. (1999). Tandem repeat recombination induced by replication fork defects in *Escherichia coli* requires a novel factor, RadC. *Genetics* 152, 5-13.
- Schiessel, H., Widom, J., Bruinsma, R.F., and Gelbart, W.M. (2001). Polymer reptation and nucleosome repositioning. *Phys Rev Lett* 86, 4414-4417.
- Schvartzman, J.B., Adolph, S., Martín-Parras, L., and Schildkraut, C.L. (1990). Evidence that replication initiates at only some of the potential origins in each oligomeric form of Bovine Papillomavirus Type 1 DNA. *Mol Cell Biol* 10, 3078-3086.
- Schvartzman, J.B., and Stasiak, A. (2004). A topological view of the replicon. *EMBO Rep* 5, 256-261.
- Seigneur, M., Bidnenko, V., Ehrlich, S.D., and Michel, B. (1998). RuvAB acts at arrested replication forks. *Cell* 95, 419-430.
- Shishido, K., Ishii, S., and Komiyaba, N. (1989). The presence of the region on pBR322 that encodes resistance to tetracycline is responsible for high levels of plasmid DNA knotting in *Escherichia coli* DNA topoisomerase I deletion mutant. *Nucleic Acids Res* 17, 9749-9759.
- Shishido, K., Komiyama, M., and Ikawa, S. (1987). Increased production of a knotted form of plasmid pBR322 DNA in *Escherichia coli* DNA topoisomerase mutants. *J Mol Biol* 195, 215-218.

Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.

Sogo, J.M., Stahl, H., Koller, T., and Knippers, R. (1986). Structure of replicating Simian Virus 40 minichromosomes. *J Mol Biol* 189, 189-204.

Sogo, J.M., Stasiak, A., Martínez-Robles, M.L., Krimer, D.B., Hernández, P., and Schvartzman, J.B. (1999). Formation of knots in partially replicated DNA molecules. *J Mol Biol* 286, 637-643.

Sonoda, E., Sasaki, M.S., Buerstedde, J.M., Bezzubova, O., Shinohara, A., Ogawa, H., Takata, M., Yamaguchi-Iwai, Y., and Takeda, S. (1998). Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J* 17, 598-608.

Southern, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-507.

Spengler, S.J., Stasiak, A., and Cozzarelli, N.R. (1985). The stereostructure of knots and catenanes produced by phage lambda integrative recombination: Implications for mechanism and DNA structure. *Cell* 42, 325-334.

Sтары, A., and Sarasin, A. (1992). Molecular Analysis of DNA Junctions Produced by Illegitimate Recombination in Human Cells. *Nucleic Acids Res* 20, 4269-4274.

Stasiak, A., and Di Capua, E. (1982). The helicity of DNA in complexes with recA protein. *Nature* 299, 185-186.

Stasiak, A., Di Capua, E., and Koller, T. (1981). Elongation of duplex DNA by recA protein. *J Mol Biol* 151, 557-564.

Stasiak, A., Katrich, V., Bednar, J., Michoud, D., and Dubochet, J. (1996). Electrophoretic mobility of DNA knots. *Nature* 384, 122.

- St-Pierre, J., Douziech, M., Bazile, F., Pascariu, M., Bonneil, E., Sauve, V., Ratsima, H., and D'Amours, D. (2009). Polo kinase regulates mitotic chromosome condensation by hyperactivation of condensin DNA supercoiling activity. *Mol Cell* 34, 416-426.
- Summers, D.K., and Sherratt, D.J. (1988). Resolution of ColE1 dimers requires a DNA sequence implicated in the three-dimensional organization of the *cer* site. *EMBO J* 7, 851-858.
- Sundin, O., and Varshavsky, A. (1980). Terminal stages of SV40 DNA replication proceed via multiply intertwined catenated dimers. *Cell* 21, 103-114.
- Sundin, O., and Varshavsky, A. (1981). Arrest of segregation leads to accumulation of highly intertwined catenated dimers dissection of the final stages of SV40 DNA replication. *Cell* 25, 659-669.
- Tanaka, S., and Diffley, J.F.X. (2002). Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase. *Nat Cell Biol* 4, 198-207.
- Uemura, T., Ohkura, H., Adachi, Y., Morino, K., Shiozaki, K., and Yanagida, M. (1987). DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. *Cell* 50, 917-925.
- Uhlmann, F., Wernic, D., Poupard, M.A., Koonin, E.V., and Nasmyth, K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* 103, 375-386.
- Ullsperger, C., Vologodskii, A.A., and Cozzarelli, N.R. (1995). Unlinking of DNA by topoisomerases during DNA replication. In *Nucleic Acids and Molecular Biology*, D.M.J. Lilley, and F. Eckstein, eds. (Berlin, Springer-Verlag), pp. 115-142.
- Vaughn, J.P., Dijkwel, P.A., and Hamlin, J.L. (1990). Replication initiates in a broad zone in the amplified CHO dihydrofolate reductase domain. *Cell* 61, 1075-1087.
- Viguera, E., Hernández, P., Krimer, D.B., Boistov, A.S., Lurz, R., Alonso, J.C., and Schvartzman, J.B. (1996). The ColE1 unidirectional origin acts as a polar replication fork pausing site. *J Biol Chem* 271, 22414-22421.

Vinograd, J., Lebowitz, R., Radloff, R., Watson, R., and Laipis, P. (1965). The twisted circular form of polyoma viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 53, 1104-1111.

Vologodskii, A. (2010). DNA supercoiling helps to unlink sister duplexes after replication. *BioEssays* 32, 9-12.

Vologodskii, A.V., Crisona, N.J., Laurie, B., Pieranski, P., Katritch, V., Dubochet, J., and Stasiak, A. (1998). Sedimentation and electrophoretic migration of DNA knots and catenanes. *J Mol Biol* 278, 1-3.

Vosberg, H.P. (1985). DNA topoisomerases: enzymes that control DNA conformation. *Curr Top Microbiol Immunol* 114, 19-102.

Wang, E.H., and Prives, C. (1991). DNA Helicase and Duplex DNA Fragment Unwinding Activities of Polyoma and Simian Virus-40 Large T-Antigen Display Similarities and Differences. *J Biol Chem* 266, 12668-12675.

Wang, J.C. (1971). Interaction between DNA and an Escherichia coli protein w. *J Mol Biol* 55, 523-534.

Wang, J.C. (1985). DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 54, 665-697.

Wang, J.C. (1987). Recent studies of DNA topoisomerases. *Biochim Biophys Acta* 909, 1-9.

Wang, J.C. (1996). DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 65, 635-692.

Wang, J.C. (1998). Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Q Rev Biophys* 31, 107-144.

Wang, J.C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3, 430-440.

Wasserman, S.A., and Cozzarelli, N.R. (1985). Determination of the stereostructure of the product of Tn3 resolvase by a general method. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 1079-1083.

Wasserman, S.A., Dungan, J.M., and Cozzarelli, N.R. (1985). Discovery of a predicted DNA knot substantiates a model for site-specific recombination. *Science* 229, 171-174.

Watson, J.D., and Crick, F.H.C. (1953a). Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acids. *Nature* 171, 964-967.

Watson, J.D., and Crick, F.H.C. (1953b). Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 161, 737-738.

Weinert, T. (1997). Yeast checkpoint controls and relevance to cancer. *Cancer Surv* 29, 109-132.

West, S.C., Cassuto, E., Mursalim, J., and Howard-Flanders, P. (1980). Recognition of duplex DNA containing single-stranded regions by recA protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 2569-2573.

White, J.H., Millett, K.C., and Cozzarelli, N.R. (1987). Description of the topological entanglement of DNA catenanes and knots by a powerful method involving strand passage and recombination. *J Mol Biol* 197, 585-603.

Wiesendanger, B., Lucchini, R., Koller, T., and Sogo, J.M. (1994). Replication fork barriers in the xenopus rDNA. *Nucleic Acids Res* 22, 5038-5046.

Witz, G., Dietler, G., and Stasiak, A. (2011). Tightening of DNA knots by supercoiling facilitates their unknotting by type II DNA topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 3608-3611.

Witz, G., and Stasiak, A. (2010). DNA supercoiling and its role in DNA decatenation and unknotting. *Nucleic Acids Res* 38, 2119-2133.

Worcel, A., and Burgi, E. (1972). On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 71, 127-147.

Yamaguchi, H., Kubota, K., and Harada, A. (2000). Preparation of DNA catenanes and observation of their topological structures by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Symp Ser*, 229-230.

Zechiedrich, E.L., and Cozzarelli, N.R. (1995). Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes & Dev* 9, 2859-2869.

Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B., and Cozzarelli, N.R. (1997). Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes & Dev* 11, 2580-2592.

Zhu, J., Newlon, C.S., and Huberman, J.A. (1992). Localization of a DNA replication origin and termination zone on chromosome III of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 12, 4733-4741.

Zhu, Q., Pongpech, P., and DiGate, R.J. (2001). Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci US Proc Natl Acad Sci USA A* 98, 9766-9771.

8. ANEXO

intense male-male competition for mates, males and females showed significant differences in either *IMR* or *RoA*, and male life span was shorter than female life span (baboons, sifaka, gorillas, chimpanzees, and capuchins; we lacked mortality data for male blue monkeys; see Fig. 1 and table S3). In contrast, male and female muriquis were indistinguishable in their *IMRs*, *RoAs*, and life spans (table S3). This male-female similarity in muriqui aging patterns, combined with the observation of multiple mating by both sexes in all of our study species, suggests that the male-male competitive environment, not just multiple mating by males, may be a key factor driving faster aging in males in polygynandrous species [see also (26)].

If demographic patterns of aging were evolutionarily constrained, we would expect closely related species of primates to exhibit similar aging patterns. Instead, the species rankings of *IMR* and *RoA* in males and females showed no relationship to phylogeny (Fig. 2C and fig. S1). This implies that the study species have not been constrained phylogenetically to high or low aging rates, and have the flexibility to respond to evolutionary forces at the species level or potentially even the local population level. Furthermore, within-species comparisons of baboons (31), chimpanzees (23, 32), and humans (23, 25) all support the view that both *IMR* and *RoA* can vary substantially among populations within a species. Notably, in all three species, populations existing in more demanding habitats, without benefit of modern medical intervention (e.g., hunter-forager humans and wild as opposed to captive primates), exhibit higher *IMR* and, for both chimpanzees and humans, higher *RoA*. That is, aging appears to be both evolutionarily labile and phenotypically plastic. The slowing of aging-related disease under dietary restriction (33) is further evidence of the flexibility of aging rates in primates.

We examined our data for the existence of mortality plateaus (34), a subject of much recent interest in the aging literature, but none of the age-specific mortality relationships in our non-human primate analyses demonstrated the type of leveling off that has been shown in human and fly data sets [e.g., (35)]. Whether additional long-term data from natural primate populations will demonstrate a generalized mortality deceleration in old age remains an open question that should motivate future comparative analyses of aging in other natural populations.

References and Notes

1. C. E. Finch, M. C. Pike, M. Witten, *Science* **249**, 902 (1990).
2. R. E. Ricklefs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 10314 (2010).
3. C. Finch, *Longevity, Senescence and the Genome* (Univ. of Chicago Press, Chicago, 1990).
4. G. A. Sacher, in *Handbook of the Biology of Aging*, C. E. Finch, L. Hayflick, Eds. (Van Nostrand Reinhold, New York, 1977), pp. 582–638.
5. W. C. Sanderson, S. Scherbov, *Science* **329**, 1287 (2010).
6. W. Lutz, W. Sanderson, S. Scherbov, *Nature* **451**, 716 (2008).

7. N. S. Gavrilova *et al.*, *Hum. Biol.* **70**, 799 (1998).
8. J. Evert, E. Lawler, H. Bogan, T. Perls, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **58**, 232 (2003).
9. R. G. J. Westendorp, T. B. L. Kirkwood, *Nature* **396**, 743 (1998).
10. T. B. L. Kirkwood, *Nature* **451**, 644 (2008).
11. A. K. Brunet-Rossini, S. N. Austad, in *Handbook of the Biology of Aging*, E. J. Masoro, S. N. Austad, Eds. (Elsevier, Amsterdam, 2006), pp. 243–266.
12. T. Clutton-Brock, B. C. Sheldon, *Science* **327**, 1207 (2010).
13. W. F. Morris *et al.*, *Am. Nat.* **177**, E14 (2011).
14. K. B. Strier *et al.*, *Methods Ecol. Evol.* **1**, 199 (2010).
15. Supporting material is provided on Science Online.
16. E. Arias, *United States life tables, 2004*. National Vital Statistics Reports (National Center for Health Statistics, Hyattsville, MD, 2007), vol. 56.
17. R. N. Anderson, *United States life tables, 1997*. National Vital Statistics Reports (National Center for Health Statistics, Hyattsville, MD, 1999), vol. 47.
18. K. W. Wachter, *Popul. Dev. Rev.* **29** (suppl.), 270 (2003).
19. K. W. Wachter, C. E. Finch, Eds., *Between Zeus and the Salmon: The Biodemography of Longevity* (National Academy Press, Washington, DC, 1997).
20. S. D. Pletcher, *J. Eval. Biol.* **12**, 430 (1999).
21. A. M. Bronikowski, D. E. L. Promislow, *Trends Ecol. Evol.* **20**, 271 (2005).
22. T. B. Gage, *Annu. Rev. Anthropol.* **27**, 197 (1998).
23. K. Hawkes, K. R. Smith, S. L. Robson, *Am. J. Hum. Biol.* **21**, 578 (2009).
24. D. E. L. Promislow, M. Tatar, A. A. Khazaeli, J. W. Cutsinger, *Genetics* **143**, 839 (1996).
25. M. Gurven, H. Kaplan, *Popul. Dev. Rev.* **33**, 321 (2007).
26. T. H. Clutton-Brock, K. Isvaran, *Proc. Biol. Sci.* **274**, 3097 (2007).
27. J. Allman, A. Rosin, R. Kumar, A. Hasenstaub, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 6866 (1998).
28. J. C. Mitani, J. Gros-Louis, A. F. Richard, *Am. Nat.* **147**, 966 (1996).
29. R. R. Lawler, A. F. Richard, M. A. Riley, *J. Hum. Evol.* **48**, 259 (2005).
30. K. B. Strier, *Behaviour* **130**, 151 (1994).
31. A. M. Bronikowski *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 9591 (2002).
32. K. Hill *et al.*, *J. Hum. Evol.* **40**, 437 (2001).
33. R. J. Colman *et al.*, *Science* **325**, 201 (2009).
34. J. W. Vaupel *et al.*, *Science* **280**, 855 (1998).
35. R. Rau, E. Soroko, D. Jasilionis, J. W. Vaupel, *Popul. Dev. Rev.* **34**, 747 (2008).
36. The National Evolutionary Synthesis Center (NESCent) and the National Center for Ecological Analysis and Synthesis (NCEAS) jointly supported the Primate Life Histories Working Group. H. Lapp and X. Liu at NESCent provided expert assistance in designing and implementing the Primate Life Histories Database (PLHD). J. Moorad commented on the manuscript. The governments of Brazil, Costa Rica, Kenya, Madagascar, Rwanda, and Tanzania provided permission for our field studies, and all research complied with guidelines in the host countries. For study-specific acknowledgments and Institutional Animal Care and Use Committee compliance, see <http://demo.plhdb.org>. The nonhuman primate data used in these analyses are available in the Dryad database (<http://dx.doi.org/10.5061/dryad.8682>).

Supporting Online Material

www.sciencemag.org/cgi/content/full/331/6022/1325/DC1
Methods
Figs. S1 to S8
Tables S1 to S10
References

13 December 2010; accepted 1 February 2011
10.1126/science.1201571

Positive Supercoiling of Mitotic DNA Drives Decatenation by Topoisomerase II in Eukaryotes

J. Baxter,^{1,4*} N. Sen,^{1†} V. López Martínez,^{2†} M. E. Monturus De Carandini,^{2†} J. B. Schwartzman,² J. F. X. Diffley,³ L. Aragón^{1*}

DNA topoisomerase II completely removes DNA intertwining, or catenation, between sister chromatids before they are segregated during cell division. How this occurs throughout the genome is poorly understood. We demonstrate that in yeast, centromeric plasmids undergo a dramatic change in their topology as the cells pass through mitosis. This change is characterized by positive supercoiling of the DNA and requires mitotic spindles and the condensin factor Smc2. When mitotic positive supercoiling occurs on decatenated DNA, it is rapidly relaxed by topoisomerase II. However, when positive supercoiling takes place in catenated plasmid, topoisomerase II activity is directed toward decatenation of the molecules before relaxation. Thus, a topological change on DNA drives topoisomerase II to decatenate molecules during mitosis, potentially driving the full decatenation of the genome.

In eukaryotes, most topological links between the DNA strands are removed during DNA replication by topoisomerases I and II (fig. S1A) (1). However, many links are converted into double-stranded DNA intertwines or catenanes during the completion of replication (2, 3). These can only be resolved by topoisomerase II (fig. S1) (4).

Passage through mitosis is required for complete decatenation, because topoisomerase II activity is essential during mitosis as late as anaphase (fig.

S1B) (4–6). Because mitotic spindles are required to complete decatenation, it is assumed to occur only after chromosome segregation during anaphase (4). However, sister chromatids appear to be fully decatenated before their physical separation by spindles (7, 8). Potential alternate mechanisms, in which decatenation is promoted by supercoiling, have been proposed in prokaryotes (9–11). These mechanisms prompted us to study whether mitotic changes to DNA topology help drive decatenation in eukaryotes.

We assayed *in vivo* DNA topology with circular plasmids, which retain topological information after DNA extraction (12). We used yeast plasmids that contain yeast-origin and centromeric sequences whose segregation behavior generally mimics that of endogenous chromosomes. However, these small plasmids are mostly decatenated

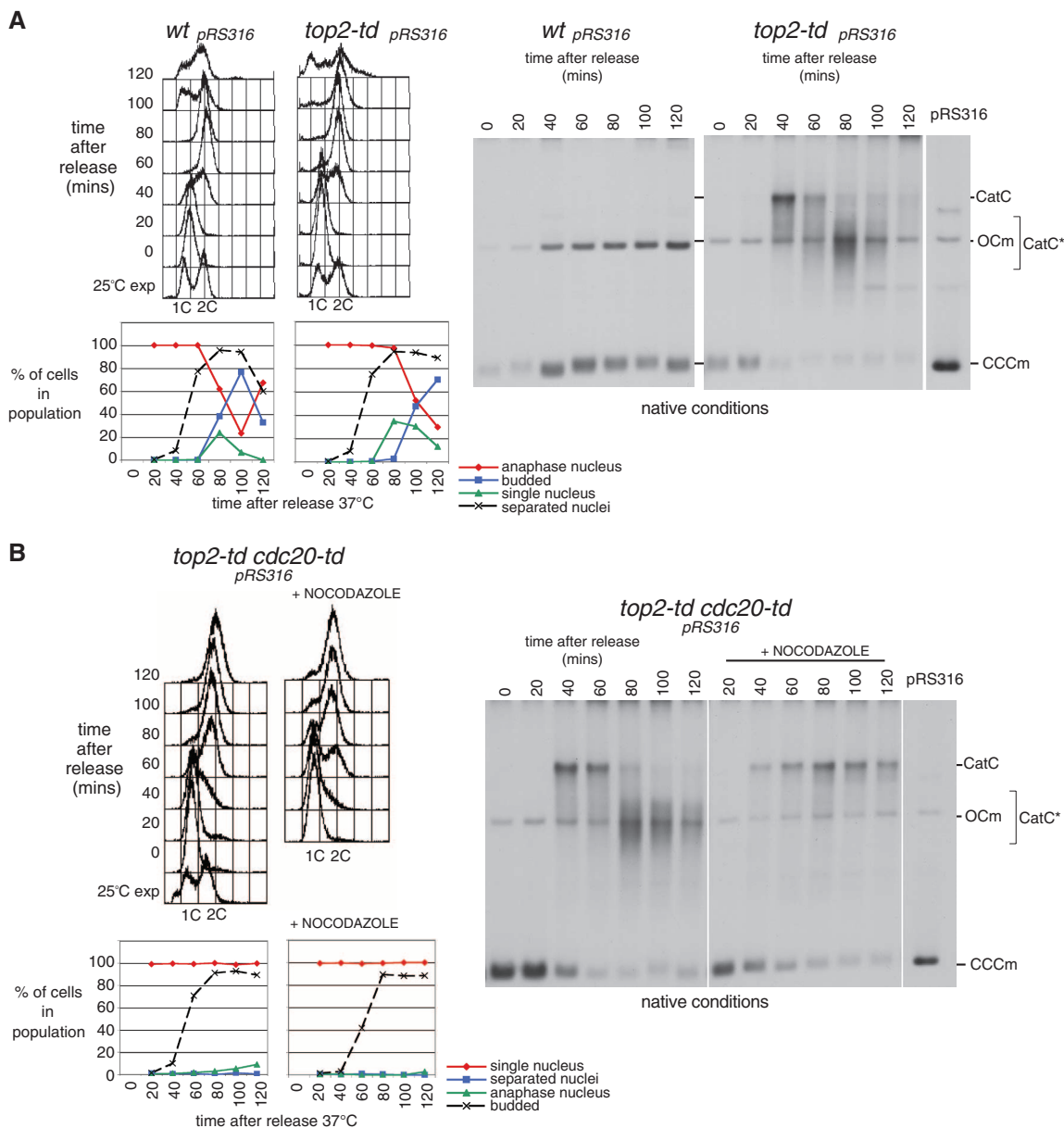
shortly after DNA replication in the presence of wild-type (WT) levels of topoisomerase II (Fig. 1A). Therefore, we used the *top2-td* degron strain (6) to ensure an enriched population of catenated DNA that could be examined through the later stages of the cell cycle. Passage through DNA replication in the absence of topoisomerase II converted the supercoiled monomer pRS316 plasmid (CCCm) into catenated plasmid dimer (CatC). Both CCCm and CatC were negatively supercoiled, consistent with normal chromatinization (6).

Assaying the electrophoretic mobility of these plasmids throughout the rest of the cell cycle showed that their mobility changed significantly between 40 and 80 min as the cells started entering anaphase (Fig. 1A). Chloroquine intercalation confirmed that the catenated plasmids were still composed of intact plasmids (fig. S2), and in

vitro topoisomerase Ib treatment confirmed that the catenated plasmids were topoisomers of the CatC dimers that formed after replication (fig. S6A). We refer to the premitotic form as C-type catenanes (CatC) and to the mitotic form as C*-type catenanes (CatC*).

The transition from CatC to CatC* coincided with chromosome segregation. In cells arrested in metaphase by depletion of the anaphase-promoting-complex activator Cdc20 (*top2-td cdc20-td*), we observed the CatC-to-CatC* transition, which indicates that it occurred before anaphase onset (Fig. 1B). We detected CatC* dimers until cells exited mitosis (fig. S3), demonstrating that the CatC* catenanes occur when both mitotic cyclin-dependent kinases are active and mitotic spindles are present. However, CatC* dimer formation did not take place in cells arrested in metaphase with the microtubule-depolymerizing drug nocodazole

Fig. 1. Mitosis and spindle formation induce a topological change in catenated plasmid DNA *in vivo*. (A) WT pRS316 and *top2-td* pRS316 cells were synchronized in G₁ and *top2-td*-depleted of Top2. The cells were synchronously released into the cell cycle, and regular samples were taken for analysis. (Histograms at left) Fluorescence-activated cell sorting analysis of DNA content and the histogram of kinetics of nuclear division and budding index. (Right panel) Autoradiogram of a blot containing cellular DNA electrophoretically resolved in agarose and probed for pRS316 sequences. Electrophoretic mobilities of CCCm (covalently closed circular monomers), OCm (open circle monomers), and CatC (covalently closed catenated dimers) are indicated. The region where the topologically modified CatC-CatC* resolve is also indicated. (B) Double degron *cdc20-td top2-td* pRS316 strains were processed as in (A), but were arrested before anaphase entry by either depletion of Cdc20 or treatment with nocodazole, in addition to Cdc20 depletion.



(Fig. 1B). Therefore, mitotic spindles are required for the transition from CatC to CatC*. The non-centromeric plasmid pRS426 did not undergo the distinct transition to CatC* in the absence of Top2 (fig. S4), suggesting that spindles must be engaged with kinetochores in cis for the transition to occur.

The CatC-to-CatC* transition was not due to residual Top2 decatenation activity in mitosis, because in vitro nicking of the two types of catenated dimers generated very similar populations of relaxed catenanes (fig. S5), indicative of similar catenation states.

To examine whether the CatC-to-CatC* transition correlated with any changes in supercoiling, we treated DNA samples enriched for either of the catenated dimers (CatC enriched by nocodazole arrest and CatC* enriched by *cdc20* arrest) with eukaryotic topoisomerase I (topo IB), which relaxes both negative and positive supercoils, or *Escherichia coli* topoisomerase I (topo IA), which relaxes only negative supercoils. Topo IB relaxed catenated dimers from both CatC and CatC* samples (fig. S6A). However, topo IA relaxed CatC but not CatC* catenanes (Fig. 2A and fig. S6A), indicating that the intertwined plasmids in CatC* dimers are positively supercoiled, whereas those in CatC are negatively supercoiled.

We used both titration analysis (Fig. 2B) and high-resolution analysis of partially nicked catenanes (fig. S6B) to confirm this finding by

demonstrating that CatC dimers responded to chloroquine intercalation as if negatively supercoiled, whereas CatC* dimers responded as if positively supercoiled. Thus, the CatC-to-CatC* transition induced by mitotic spindles is due to a change from negative supercoiling (in CatC) to positive supercoiling (in CatC*).

Because the plasmids enter mitosis in a highly catenated state (due to topoisomerase II depletion), it is possible that positive supercoiling only occurs in this experimental situation. Therefore, we analyzed the supercoiling of plasmids that were decatenated by topoisomerase II immediately after DNA replication in both the absence and presence of mitotic spindles. Cells were allowed to replicate their DNA in the presence of Top2 activity before being arrested in metaphase by nocodazole treatment. Cdc20 was depleted to prevent entry into anaphase, and nocodazole was washed off to allow mitotic spindles to form. DNA was isolated from cells in nocodazole [without spindles] and from cells after the wash-off of nocodazole [with spindles], and the supercoiling of monomer plasmids was compared. Spindle formation shifted the supercoiling distribution to a more positive state (Fig. 2C, top panel). However, the extent of positive supercoiling appeared minor compared with the increase in positive supercoiling previously observed in catenated dimers generated in the absence of Top2 (Fig. 2B and fig. S6B). Normally,

in vivo topoisomerases are extremely efficient in relaxing DNA topological perturbations. But depletion of topoisomerase II, which is used to generate catenated DNA, will also reduce the supercoiling relaxation activity of the cell. This could possibly stabilize induced positive supercoiling, promoting its detection in top2 depleted cells. To investigate this, we repeated the experiment but depleted Top2 specifically during the period when mitotic spindles were reformed. We then observed that a substantial proportion of the negatively supercoiled monomer plasmids observed in nocodazole became highly positively supercoiled when spindles formed (Fig. 2C, bottom panel). Therefore, a potent positive supercoiling activity is induced on both decatenated-monomer (Fig. 2C) and catenated-dimer plasmids (Fig. 2, A and B, and fig. S6) during mitosis. However, the induced positive supercoiling is normally rapidly relaxed by topoisomerase II (Fig. 2C).

Mitotic spindles are required to complete topoisomerase II-mediated decatenation of chromosomes during mitosis (4, 5). Here, we demonstrate that in mitosis, spindles induce a potent positive supercoiling activity on plasmid DNA. In prokaryotes, intrachromosomal supercoiling promotes decatenation (9–11). Therefore, the mitotic positive supercoiling activity could be required to promote decatenation by topoisomerase II. We treated DNA enriched for either the nega-

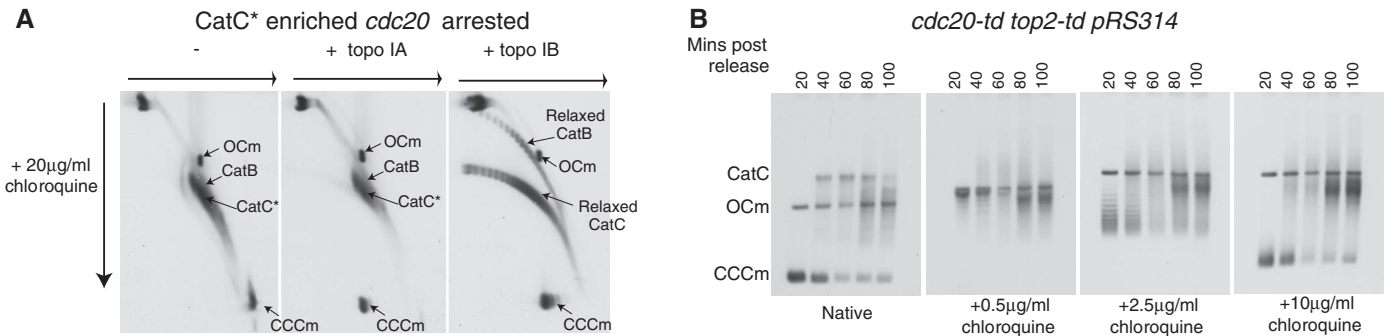


Fig. 2. Plasmids become positively supercoiled in mitosis when spindles are present. **(A)** Catenated DNA enriched for CatC* plasmids was treated with either *E. coli* topoisomerase I (topo IA) or eukaryotic topoisomerase I (topo IB). The products were visualized by two-dimensional (2D) agarose gel electrophoresis with native conditions in the first dimension and 20 μg/ml chloroquine in the second dimension. Different plasmid forms, including partially nicked catenanes (CatB), are indicated. **(B)** *top2-td top2-td pRS314* cells were processed as in Fig. 1 but with the purified DNA resolved in gels containing different concentrations of chloroquine, as indicated. **(C)** Both *cdc20-td pRS316* or *cdc20-td top2-td pRS316* cells were synchronously arrested in mitosis using nocodazole to prevent formation of mitotic spindles. Cdc20 (top) or Cdc20 and Top2 proteins (bottom) were then degraded before washing off of nocodazole to allow mitotic spindles to form. Purified DNA was analyzed in 2D chloroquine gels (12) to reveal the supercoiling distribution of the monomer plasmids. A cartoon representation of how the plasmid distribution relates to supercoiling status is shown (right).

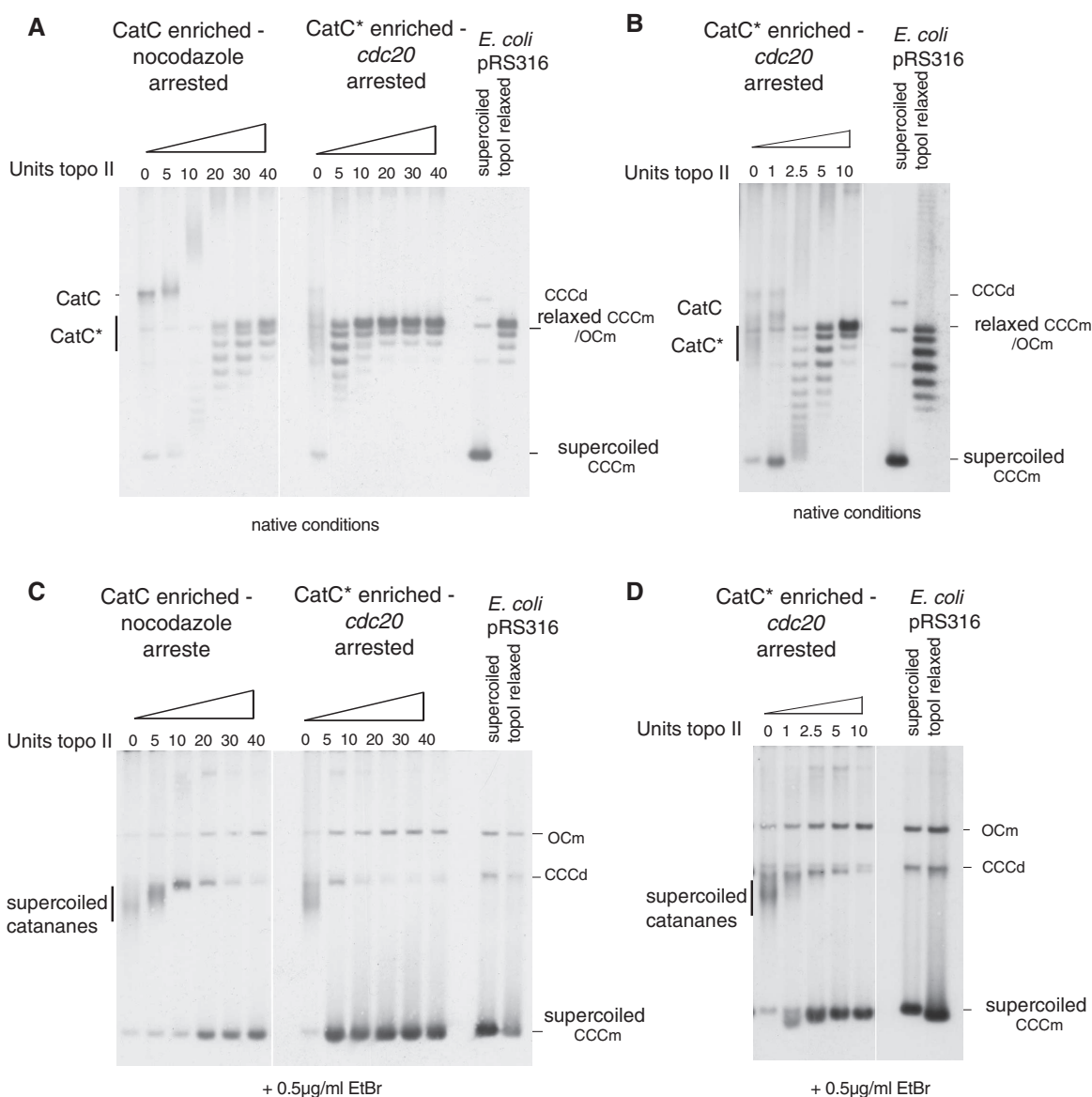
tively supercoiled CatC dimers or the positively supercoiled CatC* dimers with different amounts of recombinant topoisomerase II. Topoisomerase II treatment of CatC dimers (nocodazole-arrested) initially produced catenanes with progressively slower electrophoretic mobilities. Resolved monomers were only observed at relatively high enzyme concentrations (>20 units) (Fig. 3, A and C). The kinetics that we observed are consistent with topoisomerase II concurrently relaxing negative supercoils and decatenating the interplasmid links in CatC dimers, so that when the final catenanes are resolved, only a small number of supercoils remain on the monomer plasmids. In contrast, the positively supercoiled CatC* plasmids (*cdc20*-arrested) were fully decatenated at the lowest topoisomerase II concentration tested (Fig. 3A). Decatenation of the CatC* dimers required one order of magnitude fewer units of enzyme (Fig. 3, B and D). The CatC* catenanes were resolved directly into highly supercoiled

monomers at low topoisomerase concentrations, and we observed relaxation of the resultant supercoiled monomers only after complete decatenation (Fig. 3B). Therefore, although positive supercoiling of decatenated monomer plasmids is rapidly followed by topoisomerase II relaxation, induction of positive supercoiling on catenated plasmids drives topoisomerase II to resolve any intermolecular catenated links before positive-supercoil relaxation.

We surmised that kinetochore attachment may indirectly induce topological change through activation of centromere-associated complexes that can modulate DNA topology. One such candidate complex is the condensin SMC2/4 complex (13, 14). We asked whether SMC2 activity was required for the positive supercoiling that characterizes CatC* by assessing whether the transition from CatC to CatC* occurs in the condensin *smc2-8* mutant background (15). DNA replication in the absence of SMC2 and TOP2 function gen-

erated significant levels of CatC dimers (Fig. 4A). However, no transition from CatC to CatC* could be observed (Fig. 4A), despite the normal formation of mitotic spindles in this background (fig. S7). Furthermore, Smc2 function was required for the positive supercoiling of decatenated monomer plasmids. Formation of mitotic spindles in the *top2-td* strain with WT Smc2 function generated high levels of positive supercoiling in the monomer plasmids (Fig. 4B, left panel). However, positively supercoiled plasmids could not be observed when Smc2 function was disrupted (Fig. 4B, middle panel). The absence of positively supercoiled monomers was not due to a lack of functional spindles, because both the *smc2-8* *top2-td* and *top2-td* cells had similar numbers of cells undergoing anaphase and nuclear segregation after formation of mitotic spindles (Fig. 4B, right panels). Thus, we conclude that Smc2 function is required for the mitotic positive-supercoiling activity.

Fig. 3. CatC* catenated plasmids are preferentially decatenated by topoisomerase II in vitro. Catenated DNA enriched for CatC plasmids (nocodazole-arrested) or catenated DNA enriched for CatC* plasmids (*cdc20*-arrested) was treated in vitro with recombinant topoisomerase II α , and the products were analyzed on agarose gels. Autoradiograms of blots where the DNA was treated with 5 to 40 units [(A) and (C)] or 1 to 10 units of enzyme [(B) and (D)] are shown. Products were resolved in either native agarose [(A) and (B)] or agarose containing 0.5 μ g/ml EtBr [(C) and (D)] to confirm that plasmids remained covalently closed during treatment. 5×10^{-9} grams of purified (*E. coli*) supercoiled and relaxed (topo I-treated) pRS316 was also resolved on each gel.



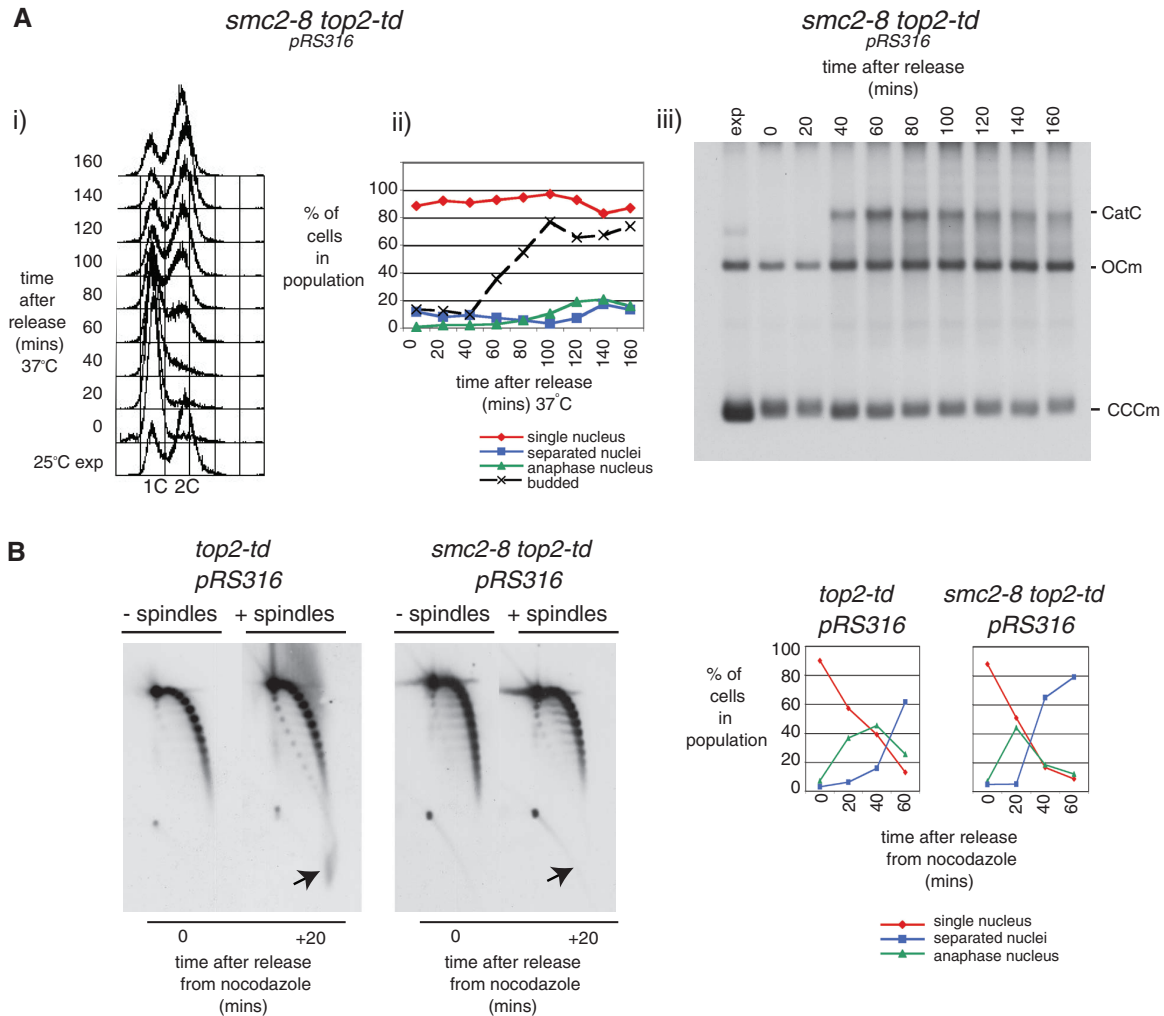


Fig. 4. Condensin SMC2 is required to positively supercoil plasmids during mitosis. (A) *smc2-8 top2-td pRS316* cells were processed as in Fig. 1 to assess the electrophoretic mobility of the plasmid after disruption of both SMC2 and TOP2 functions. (B) *top2-td* and *smc2-8 top2-td* cells were processed as in Fig. 2C to specifically disrupt TOP2 and SMC2 during the period when mitotic

spindles were formed in the cells after washing off of nocodazole and anaphase entry. (Left) Autoradiograms of plasmid supercoiling in nocodazole and 20 min after washing off are shown. Highly positively supercoiled monomers are indicated by arrows. (Right) Histogram indicating nuclear morphology of cells before and after nocodazole wash-off is shown.

Extrapolating from our data and previously proposed hypothetical models (10, 16) of how SMC-mediated compaction may facilitate chromosome decatenation, we propose a model for how complete decatenation of the genome by topoisomerase II is accomplished during mitosis (outlined in fig. S8). Although Top2 can actively remove catenations between sister chromatids postreplication, residual catenanes are present at the time of mitosis (hence, the observed requirement for Top2 at this stage of the cell cycle). We propose that extensive positive supercoiling induced by mitotic spindles and condensin generates a topology on catenated chromosomes where intermolecular crossovers are isolated from intramolecular crossovers with a geometry that maximizes topoisomerase II decatenation activity. Once the sister chromatids are fully decatenated, topoisomerase II rapidly relaxes the positive supercoiling generated, returning the intrachromosomal topology of the sister chromatids to a state comparable to that observed before

the transition, except that now, crucially, all catenated links have been removed.

References and Notes

1. J. C. Wang, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 430 (2002).
2. O. Sundin, A. Varshavsky, *Cell* **21**, 103 (1980).
3. O. Sundin, A. Varshavsky, *Cell* **25**, 659 (1981).
4. C. Holm, T. Goto, J. C. Wang, D. Botstein, *Cell* **41**, 553 (1985).
5. T. Uemura *et al.*, *Cell* **50**, 917 (1987).
6. J. Baxter, J. F. Diffley, *Mol. Cell* **30**, 790 (2008).
7. R. A. Oliveira, R. S. Hamilton, A. Pauli, I. Davis, K. Nasmyth, *Nat. Cell Biol.* **12**, 185 (2010).
8. F. Uhlmann, D. Wernic, M. A. Poupart, E. V. Koonin, K. Nasmyth, *Cell* **103**, 375 (2000).
9. E. L. Zechiedrich, A. B. Khodursky, N. R. Cozzarelli, *Genes Dev.* **11**, 2580 (1997).
10. C. D. Hardy, N. J. Crisano, M. D. Stone, N. R. Cozzarelli, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B Biol. Sci.* **359**, 39 (2004).
11. M. L. Martínez-Robles *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **37**, 5126 (2009).
12. Materials and methods are available as supporting material on Science Online.
13. K. Kimura, M. Hirano, R. Kobayashi, T. Hirano, *Science* **282**, 487 (1998).
14. J. St-Pierre *et al.*, *Mol. Cell* **34**, 416 (2009).
15. L. Freeman, L. Aragon-Alcaide, A. Strunnikov, *J. Cell Biol.* **149**, 811 (2000).
16. T. Hirano, *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 115 (2000).
17. We thank members of the Aragon laboratory, M. Merkenschlager, A. Carr, and J. Murray for discussions and critical reading of the manuscript. We also thank K. Nasmyth and S. Henikoff for helpful discussions, as well as anonymous referees for useful suggestions. This work was funded by European Research Council starting grant 202337 (L.A. and J.B.), the Royal Society (J.B.), the Spanish government grant BFU2008-00408/BMC (J.B.S.), Cancer Research UK (J.F.X.D.), and the MRC UK (L.A.). Extended figure legends are available in the supporting online material.

Supporting Online Material

www.sciencemag.org/cgi/content/full/331/6022/1328/DC1

Materials and Methods

SOM Text

Figs. S1 to S8

Table S1

References

10 December 2010; accepted 28 January 2011
10.1126/science.1201538

